

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-229182

(43)公開日 平成4年(1992)8月18日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/56	Z N A			
A 0 1 H 1/00		A 8502-2B		
5/00		A 8502-2B		
		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A
		7236-4B	5/00	C
審査請求 未請求 請求項の数64(全 49 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平3-170549	(71)出願人	390023146 チバーガイギー アクチエンゲゼルシャフト C I B A - G E I G Y A K T I E N G E S E L L S C H A F T スイス国 4002 バーゼル クリベツクシ ユトラーセ 141
(22)出願日	平成3年(1991)6月15日	(72)発明者	トーマス ボーレル スイス国 4104 オーベルヴィル イム トーマスガルテン 40
(31)優先権主張番号	2 0 0 7 / 9 0 - 9	(74)代理人	弁理士 尊 経夫 (外2名)
(32)優先日	1990年6月15日		
(33)優先権主張国	スイス (CH)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 新規シグナル配列

(57)【要約】

【目的】 遺伝子工学の手法を用いて、植物細胞内で溶解区画並びに貯蔵物質、解毒剤および防御物質のための最大の貯蔵区画を形成する液胞に、タンパク質を特異的に方向づける。

【構成】 植物の液胞タンパク質のC末端領域から得られ、かつあらゆる所望のタンパク質分子と操作可能に連結されて、その結合タンパク質が特異的に植物液胞に方向づけられることを確実にするペプチド断片(標的性シグナル)、および該ペプチド断片をコードするDNA分子。該DNA分子に発現性DNAが操作可能に連結された組換えDNA分子、それから誘導されたベクター。該組換えDNA分子またはベクターを含む宿主細胞(有機体)およびトランスジェニック植物。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 あらゆる所望の結合された遺伝子産物を特異的に植物液胞内に方向づける（標的として導く）のに関連する短いペプチド断片をコードするDNA配列。

【請求項2】 液胞に本来存在するタンパク質分子をコードする遺伝子の3'末端領域から得られ、かつ結合された遺伝子産物を特異的に植物液胞内に方向づける（標的として導く）のに関連する短いC末端ペプチド断片（C末端範囲）をコードする請求項1記載のDNA配列。

【請求項3】 植物キチナーゼ遺伝子の3'末端領域から得られ、そして結合された遺伝子産物を特異的に植物液胞内に方向づける（標的として導く）のに関連する短いC末端ペプチド断片（C末端範囲）をコードする請求項1記載のDNA配列。

【請求項4】 植物グルカナーゼ遺伝子の3'末端領域から得られ、そして結合された遺伝子産物を特異的に植物液胞内に方向づける（標的として導く）のに関連する短いC末端ペプチド断片（C末端範囲）をコードする請求項1記載のDNA配列。

【請求項5】 結合された遺伝子産物を特異的に植物液胞内に方向づける（標的として導く）のに関連する短いペプチド断片をコードし、そして以下の配列番号：1：
CGN/AGR TCN/AGW TTY GGN AAY GGN CTN/TTR TTR/CTN GT N GAY ACN ATG TAA

（ただし、NはAまたはGまたはCまたはT/Uであり、RはGまたはAであり、WはAまたはT/Uであり、そしてYはT/UまたはCである）で示されるヌクレオチド配列を有する請求項1記載のDNA配列または元のペプチド断片の典型的な標的特性を依然有するペプチド断片をコードするそれらの突然変異体もしくは変種。

【請求項6】 実質的に純粋な形態にあり、ニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425植物の塩基性キチナーゼ遺伝子の3'末端領域から得られ、そして以下の配列番号：2：

3' -AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA -5'

で示されるヌクレオチド配列を実質的に有する請求項3記載のDNA配列または元のペプチド断片の典型的な標的特性を依然有するペプチド断片をコードするそれらの突然変異体もしくは変種。

【請求項7】 実質的に純粋な形態にあり、ニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425植物の塩基性グルカナーゼ遺伝子の3'末端領域から得られ、そして以下の配列番号：12：

GTC TCT GGT GGA GTT TGG GAC AGT TCA GTT GAA ACT AA T GCT ACT GCT TCT CTCGTA AGT GAG ATG TGA

で示されるヌクレオチド配列を実質的に有する請求項4記載のDNA配列または元のペプチド断片の典型的な標

2

的特性を依然有するペプチド断片をコードするそれらの突然変異体もしくは変種。

【請求項8】 あらゆる所望の結合されたタンパク質分子を特異的に植物液胞内に方向づける（標的として導く）のに関連し、かつ請求項1記載のDNA配列によりコードされるペプチド断片。

【請求項9】 あらゆる所望の結合されたタンパク質分子を特異的に植物液胞内に方向づける（標的として導く）のに関連し、かつ該液胞に本来存在するタンパク質分子のC末端範囲から得られる請求項8記載のペプチド断片。

【請求項10】 植物キチナーゼのC末端範囲から得られる請求項9記載のペプチド断片。

【請求項11】 植物グルカナーゼのC末端範囲から得られる請求項9記載のペプチド断片。

【請求項12】 植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、かつ以下の配列番号：1および2：

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met

で示されるアミノ酸配列を有する請求項10記載のペプチド断片または元のペプチド断片の典型的な標的特性を依然有するそれらの突然変異体もしくは変種。

【請求項13】 植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、かつ以下の配列番号：12：

Val Ser Gly Gly Val Trp Asp Ser Ser Val Glu Thr Asn Ala Thr Ala Ser LeuVal Ser Glu Met

で示されるアミノ酸配列を有する請求項11記載のペプチド断片または元のペプチド断片の典型的な標的特性を依然有するそれらの突然変異体もしくは変種。

【請求項14】 請求項1ないし7のいずれか1項に示されたDNA配列に実質的に相同であり、そしてその配列の特性を依然有する、すなわち植物液胞のための標的性シグナルとして作用するC末端ペプチドをコードするDNA配列。

【請求項15】 請求項1ないし7のいずれか1項に示されたDNA配列の自然に生じる変種または突然変異体である請求項14記載のDNA配列。

【請求項16】 公知の突然変異方法により作成された請求項14記載のDNA配列。

【請求項17】 突然変異方法がオリゴヌクレオチド仲介突然変異誘発である請求項16記載のDNA配列。

【請求項18】 配列番号：3ないし7：

(a) AGG TCT TTT GGA AAA GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

(b) AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC AAT ACT ATG TAA

(c) AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC CGT ACT ATG TAA

(d) A/T GAT CTT TTG GGA AAT GGA CTTTGA GTC GAT ACT ATG TAA

(e) ATC GGT GAT CTT TTA GTCGAT

3

ACT ATG TAA

で示されるヌクレオチド配列の一つを有する請求項17記載のDNA配列。

【請求項19】 請求項14ないし18のいずれか1項に記載のDNA配列によりコードされ、かつ液胞に本来存在するタンパク質分子のC末端領域に位置する未変性のペプチド断片と同様の標的特性を依然有する変性ペプチド断片。

【請求項20】 タンパク質分子と結合して植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、かつ配列番号：3ないし7：

(a) Arg Ser Phe Gly Lys Asp Leu LeuVal Asp Thr Met End

(b) Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu LeuVal Asn Thr Met End

(c) Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu LeuVal Arg Thr Met End

(d) Asp Leu Leu Gly Asn Gly Leu LeuVal Asp Thr Met End

(e) Ile Gly Asp Leu LeuVal Asp Thr Met End

で示されるアミノ酸配列の一つを有する請求項19記載の変性ペプチド断片。

【請求項21】 請求項1ないし7または14ないし18のいずれか1項に記載のDNA配列またはDNA配列の誘導体から得られ、かつ出発配列によりコードされたペプチド断片の特異的標的特性を依然有するペプチド断片をコードする断片または部分配列。

【請求項22】 配列番号：8および9：

CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

で示されるヌクレオチド配列の一つを実質的に有する請求項21記載の部分的DNA配列または出発配列によりコードされたペプチド断片の典型的標的特性を依然有するペプチド断片をコードするそれらの突然変異体もしくは変種。

【請求項23】 請求項18記載の部分的DNA配列の一つによりコードされ、かつ植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、そして配列番号：8および9：

Leu Leu Val Asp Thr Met End

Gly Leu Leu Val Asp Thr Met End

で示されるアミノ酸配列の一つを有するペプチド断片または元のペプチド断片の典型的標的特性を依然有するそれらの突然変異体もしくは変種。

【請求項24】 発現性DNAが請求項1ないし7、14ないし18または21もしくは22のいずれか1項に記載のDNA配列に操作可能な様式で連結されているキメラ遺伝子構築物からなる組換えDNA分子。

【請求項25】 あらゆる所望の発現性DNAが請求項1ないし7、14ないし18または21もしくは22の

4

いずれか1項に記載のDNA配列、ならびに植物細胞内で活性な発現シグナルおよび場合により3'および/または5'領域のその他のコード性配列および/または非コード性配列に操作可能に連結され、その結果植物宿主内で形質転換して、発現産物が特異的に植物液胞内に方向づけられるキメラ遺伝子構築物からなる請求項24記載の組換えDNA分子。

【請求項26】 発現シグナルが植物または植物ウイルスの遺伝子に由来するか、またはバクテリアの発現シグナルである請求項25記載の組換えDNA分子。

【請求項27】 発現シグナルがカリフラワーモザイクウイルス遺伝子(CaMV)のプロモーターおよび/または終結シグナルである請求項26記載の組換えDNA分子。

【請求項28】 発現シグナルがアグロバクテリウム・チュメファシエンシスのTiプラスミドからのノパリンシスターゼ遺伝子(nos)および/またはオクトピンシスターゼ遺伝子(ocs)の発現シグナルである請求項26記載の組換えDNA分子。

【請求項29】 誘導または抑制の意味において、植物組織内で、結合されたDNA配列の転写を調節し得る3'および/または5'領域の追加的な非コード性調節DNA配列を含む請求項25記載の組換えDNA分子。

【請求項30】 発現性DNAが、植物細胞内で機能し得るN末端シグナルペプチドをコードする配列を5'末端に本来含むか、またはそのような配列に操作可能な様式に連結されている請求項25記載の組換えDNA分子。

【請求項31】 標的性配列と結合された発現性DNAが、形質転換された植物細胞およびそれから成長する組織、そして特に植物それ自体に、病原体、化学物質および不利な環境要因に対する保護効果を与え得る構造遺伝子である請求項24または25のいずれかに記載の組換えDNA分子。

【請求項32】 構造遺伝子が植物細胞内でキチナーゼを発現する遺伝子である請求項31記載の組換えDNA分子。

【請求項33】 構造遺伝子が植物細胞内でグルカナーゼを発現する遺伝子である請求項31記載の組換えDNA分子。

【請求項34】 標的性配列と結合された発現性DNAが、形質転換された植物細胞自体または組織、器官、カルス、胚および植物全体からなる群から選択されるより高度なオーガナイゼーションの単位の部分において発現して、植物液胞内に方向づけられる発現産物を生じる請求項24または25のいずれかに記載の組換えDNA分子。

【請求項35】 選択性表現型マーカーをコードするDNA配列をさらに含む請求項24または25のいずれかに記載の組換えDNA分子。

5

【請求項36】 1種またはそれ以上の微生物中での複製を可能にする複製の開始点をさらに含む請求項24または25のいずれかに記載の組換えDNA分子。

【請求項37】 植物細胞内で活性化発現シグナルと操作可能に連結しており、そして液胞内に本来存在する遺伝子産物をコードする構造遺伝子であって、該遺伝子内に本来存在する3'末端標的性配列は欠失されるか、または不活性化されており、そしてそれ故に植物宿主内で形質転換して、機能的C末端シグナル配列を含まず、そして植物の細胞外空間内に分泌される発現産物を産生する上記構造遺伝子を含む組換えDNA分子。

【請求項38】 構造遺伝子が塩基性キチナーゼ遺伝子である請求項37記載の組換えDNA分子。

【請求項39】 構造遺伝子が塩基性グルカナーゼ遺伝子である請求項37記載の組換えDNA分子。

【請求項40】 請求項24ないし39のいずれか1項に記載の組換えDNA分子を含むクローニングベクター。

【請求項41】 請求項24ないし39のいずれか1項に記載の組換えDNA分子を含む形質転換ベクターおよび/または発現ベクター。

【請求項42】 大腸菌およびアグロバクテリウム・チュメファシエンスの両方において安定に複製し得る、請求項36記載の組換えDNA分子を含むシャトルベクター。

【請求項43】 請求項24ないし39のいずれか1項に記載の組換えDNA分子または請求項40ないし42のいずれか1項に記載のベクターを含む宿主有機体。

【請求項44】 バクテリアであるか、またはプロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、種子、胚、花粉、胚珠、接合子その他からなる群から選択される植物材料である請求項43記載の宿主有機体。

【請求項45】 請求項24ないし39のいずれか1項に記載の組換えDNA分子および/または請求項40ないし42のいずれか1項に記載のベクターを含む、トランスジェニック植物ならびにその有性および無性の後代。

【請求項46】 野生型に比べ植物液胞内に著しく増加されたタンパク質含量を有する、トランスジェニック植物ならびにその有性および無性の後代。

【請求項47】 野生型に比べ植物液胞内に著しく増加されたキチナーゼ含量を有する、トランスジェニック植物ならびにその有性および無性の後代。

【請求項48】 請求項44記載の形質転換された植物材料から再生されたトランスジェニック植物。

【請求項49】 稔性植物である請求項45ないし48のいずれか1項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項50】 請求項45ないし49のいずれか1項に記載のトランスジェニック植物の増殖材料。

【請求項51】 請求項45ないし49のいずれか1項

6

に記載のトランスジェニック植物の部分。

【請求項52】 以下の工程：

(a) まず最初に、液胞内に特異的に方向づけるのに関連するDNA配列を公知方法により、適当な供給源から単離するか、または合成し、

(b) 該DNA配列をあらゆる所望の発現性DNA配列の3'末端に操作可能な様式で挿入し、

(c) 生成した構築物を植物発現ベクター中に植物内で活性な発現シグナルの制御下にクローニングし、そして

(d) 該発現ベクターを植物宿主内に形質転換し、そしてその中で発現ベクターを発現させる、

から実質的になる植物液胞内に発現産物を標的にむけて方向づける方法。

【請求項53】 発現性DNAが、植物細胞中で機能し得るN末端シグナルペプチドをコードする配列をその5'末端領域に含むか、またはそのような配列に操作可能な様式で連結されている請求項52記載の方法。

【請求項54】 発現性DNA配列が構造遺伝子である請求項52記載の方法。

【請求項55】 構造遺伝子が結合された標的性配列に関して異種である請求項54記載の方法。

【請求項56】 標的性配列を本来含み、そしてそれ故に植物液胞内に通常方向づけられる植物タンパク質を細胞外空間に送り出す方法であって、以下の工程：

(a) 上記タンパク質をコードするDNA配列を単離し、

(b) 特定の細胞区画への方向づけに関連するC末端にある標的性配列を読み枠から除去し、

(c) 上記の変異させたDNA配列を適当な植物発現ベクター中にスプライシングし、そして

(d) 生成した構築物を植物宿主内に形質転換する、から実質的になる上記方法。

【請求項57】 植物液胞内に本来存在するタンパク質分子のC末端範囲をコードするDNA配列を公知方法により結合された構造遺伝子の3'末端領域から単離し、そして適当である場合、標的特性を変更することなく上記配列を変更することからなる、あらゆる所望の結合された遺伝子産物を特異的に植物液胞内に方向づける(標的として導く)のに関連するペプチド断片をコードする短いDNA配列の製造方法。

【請求項58】 化学的方法によりDNA配列を合成することからなる、請求項1ないし7、14ないし18または21もしくは22のいずれか1項に記載のDNA配列の製造方法。

【請求項59】 適当なcDNAまたはゲノムDNAクローンの3'末端からコード性DNA配列を単離することからなる請求項57記載の方法。

【請求項60】 あらゆる所望の発現性DNAを請求項1ないし7、14ないし18または21もしくは22の

いずれか1項に記載のDNA配列、ならびに植物細胞内で活性な発現シグナルおよび場合により3'および/または5'領域のその他のコード性配列および/または非コード性配列に操作可能な様式で連結し、その結果植物宿主内で形質転換して、発現産物が特異的に植物液胞内に方向づけられることからなる組換えDNA分子の製造方法。

【請求項61】 発現性DNAが、植物細胞中で機能し得るN末端シグナルペプチドをコードする配列をその5'末端領域に含むか、またはそのような配列に操作可能な様式で連結されている請求項60記載の方法。

【請求項62】 以下の工程：

(a) まず最初に、液胞内に特異的に方向づけるのに関連するDNA配列を公知方法により、適当な供給源から単離するか、または合成し、

(b) 該DNA配列をあらゆる所望の発現性DNA配列の3'末端に操作可能な様式で挿入し、

(c) 生成した構築物を植物発現ベクター中に植物内で活性な発現シグナルの制御下にクローニングし、

(d) 該発現ベクターを植物宿主内に公知方法により形質転換し、そしてその中で発現ベクターを発現させ、そして

(e) そのように処理された植物材料をスクリーニングし、そして陽性の形質転換体を単離する、からなる植物液胞内に特異的に方向づけられる遺伝子産物を含む形質転換された植物材料の作出方法。

【請求項63】 細胞外空間に特異的に分泌される遺伝子産物(タンパク質)を含む形質転換された植物材料の作出方法であって、以下の工程：

(a) 上記タンパク質をコードするDNA配列を単離し、

(b) 特定の細胞区画への方向づけに関連するC末端で標的性配列を読み枠から除去し、

(c) 上記の変異させたDNA配列を適当な植物発現ベクター中にスプライシングし、

(d) 生成した構築物を植物宿主内に形質転換し、そして

(e) そのように処理された植物材料をスクリーニングし、そして陽性の形質転換体を単離する、からなる上記方法。

【請求項64】 最初に適当な植物材料からcDNAまたはゲノム遺伝子ライブラリーを作成し、そしてプローブ分子として請求項1ないし7、14ないし18または21もしくは22のいずれか1項に記載のDNA配列を用いて、前記プローブ分子とハイブリッド形成し得る相同DNA配列の存在を求めて前記ライブラリーを調べることからなる、新規標識性配列の位置決定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なペプチド断片

(標的性シグナル)に関し、より詳しくは、植物液胞タンパク質のC末端領域(C末端範囲)から得られ、かつあらゆる所望のタンパク質分子と操作可能に結合されて、それらのペプチド断片と結合したタンパク質が特異的に植物液胞に方向づけられることを確実にするペプチド断片に関する。

【0002】 本発明はまた、上で詳細に特徴づけられたペプチド断片をコードし、そしてあらゆる所望の発現性DNAと操作可能に連結されて、特異的に植物液胞に方向づけられる遺伝子産物を生じるDNA配列、およびそれらの突然変異体および変種に関する。

【0003】 本発明はさらに、発現性DNAと操作可能に連結された本発明に係るDNA配列を含む組換えDNA分子、およびそれから誘導されたベクターに関する。また、上記組換えDNAまたはそれから誘導されたベクターを含むトランスジェニック植物などの宿主細胞および/または宿主有機体をも包含する。

【0004】 本発明はまた、本発明に係るDNA配列ならびに該DNA配列を含む組換えDNA分子およびベクターの製法、およびトランスジェニック植物作出のためのそれらの使用にも関する。

【0005】

【従来の技術】 遺伝子工学において、結合した遺伝子産物とその機能に従って特定の目的地に到達させ、その場所で最適活性を示し得るか、または適当な方法で貯蔵され得る、いわゆるシグナル配列をコードするDNA配列を同定することは、挿入された外来遺伝子の純粋な発現以上に近年興味が高まってきている。概して植物に関し、このことは、挿入された外来遺伝子の組織および/または成長特異的発現を可能にするプロモーターの同定または開発のための試みがなされていることを意味する。

【0006】 挿入された外来遺伝子またはそれらの発現産物の標的または目的地指向配置は植物のレベルで適切であるばかりでなく、特に形質転換の効果に関し細胞レベルでも非常に重要である。

【0007】 例えば、植物ならびにその他の真核細胞において、大部分のタンパク質が細胞質リボソーム上で合成されるけれども、非常に多くのタンパク質が全く異なる細胞下区画において要求されることが知られている。唯一の例外は、それらが使用される場所で製造されるミトコンドリアおよび葉緑素のいくつかのタンパク質により形成される。他方、細胞質で製造されたタンパク質は細胞を貫通する内膜系に沿って細胞の溶解区画(液胞、リソソーム)および細胞外空間に運ばれるか、またはそれらの特定の区画(液胞、葉緑素、ペロキシソーム)により直接取り込まれる。

【0008】 細胞下レベルでこの区画化の維持のために、細胞質で製造されたタンパク質がそれらの機能に従って分配されることを確実にする細胞内での特異的輸送

および選別系がなければならぬ。それ故に、これらのタンパク質は、細胞の輸送および選別系がそれら自身の特定の基質を認識し、そして該基質をそれらの特定の目的地に方向づけることを可能にする情報の付加事項を一つまたはそれ以上含んでいなければならない。従って、例えば、ミトコンドリアおよび葉緑素タンパク質の非常に多くの細胞質前駆体において、タンパク質がそれらの特定の区画に取り込まれることを確実にするいわゆる輸送ペプチドをN末端に検出することが可能であった。同様に、核タンパク質は細胞核特異的配列を有する。

【0009】細胞内タンパク質輸送にとって特に重要なのは細胞の内膜系である。細胞を貫通し、そして小胞体およびゴルジ装置からなるこの膜系はタンパク質、特に細胞質で製造されたタンパク質を溶解区画（液胞、リソソーム）および細胞外空間に輸送するために実質的に機能する。

【0010】内膜系を介して輸送されたタンパク質は小胞体をまず最初に通過する。この段階で必要な輸送シグナルは分子のN末端にあるシグナル配列、いわゆるシグナルペプチドにより示される。このシグナルペプチドはその機能を果たすとすぐに、前駆体タンパク質からタンパク質分解的に分離除去される。その特異的な機能のために、このタイプのシグナルペプチド配列は、バクテリア、酵母、菌類、動物または植物によらず全ての生存細胞において進化の間に高度に保存されてきた。

【0011】その他の選別段階は次いでゴルジ装置で起こり、そこでは溶解区画（液胞、リソソーム）に意図されたタンパク質および細胞外空間への分泌が意図されたタンパク質の分離が行われている。酵母および動物に関する実験では、追加のシグナルを含まないタンパク質が細胞外空間内に自動的に明らかに分泌され、一方、そのような追加の選別シグナルを含むタンパク質は溶解区画に送り出されることが見出されている。

【0012】この選別シグナルの性質は非常に広範囲に変化し得る。これまで研究された動物において、例えば、それは一般的に糖タンパク質のグリカン鎖、すなわちマンノース6-ホスフェート基内での特異的修飾である。この基は特異的なマンノース6-ホスフェートレセプターにより認識され、その結果特定の小胞中の相当するタンパク質がゴルジ装置から供給され、そしてリソソームに輸送される。しかしながら、どのポリペプチド配列がグリカン側鎖中のマンノース基のリン酸化に刺激を与えるかを決定することはこれまで可能ではなかった。

【0013】酵母において、溶解区画のための相当する選別シグナルはグリカン鎖ではなくアミノ酸配列であり、シグナルペプチドの除去の後、タンパク質のN末端を形成する。液胞のためのこのN末端標的性シグナルはプロテイナーゼAによりそれ自身液胞内で一般に分離除去される。しばしば、液胞内に輸送されたタンパク質は、標的性シグナルを分離除去してはじめて、酵素的に

活性な酵素になる。

【0014】植物において、液胞が植物細胞の溶解区画を示すだけでなく、貯蔵物質、解毒剤および防御物質のための最大の貯蔵区画を形成するから、タンパク質を液胞に方向づけるのに関連する標的性シグナルの問題は特に応用の観点から非常に興味深い〔6〕（なお、〔 〕内の数字は参考文献一覧の番号に一致する）。

【0015】それ故に、液胞が溶解物質のための植物細胞中でとびぬけて大きな区画であるから、植物の栄養含量における改良に関連したタンパク質を特異的に液胞に方向づけ、そしてそれらをそこに貯蔵することが可能であることは非常に有利である。塊茎、球根、根および茎の最も重要な貯蔵タンパク質は例えばこれらの器官を構成する細胞の液胞中に局在している〔6〕。さらに、ほとんどの種子の貯蔵タンパク質はいわゆるタンパク体、特殊化液胞に局在しており、この液胞には同様の標的性シグナルが植物器官の液胞に対するように当てはまるものと思われる。

【0016】同様の考えはまた、有害生物または疾病の防除において使用され得る物質（それらの物質がそれ自体植物に対して毒性であると証明されている場合に特に）に対して当てはまる。それ故に、それらの物質を植物液胞中に蓄積することも有利である。最終的に、ある場合には、液胞は、例えば植物により合成された解毒剤を貯蔵することによる解毒器官としても作用する〔6〕。それ故に、解毒酵素を特異的に液胞に方向づける試みがなされている。

【0017】しかしながら、例えば、ある種の病原菌による栽培植物の攻撃の場合に問題が明らかに生じる。これらの病原菌は植物の細胞内空間を介して菌糸体を広げることにより宿主植物を冒す。これらの病原体を防除するために使用され得るキチナーゼおよびグルカナーゼは非常に多く液胞中に局在するから、細胞内空間での生体利用性は元々非常に限定されている。それ故に、その場合には、細胞内空間内におけるそれらの物質の生体利用性を高め、そして病原菌の有効な防除を可能にするために、細胞外区画に特異的に上記タンパク質を送り出せることが望ましい。

【0018】細胞外空間への分泌はまた、特定の物質が細胞培養体を用いて製造される場合に有利である。その場合、方向づけられた外来タンパク質は細胞外空間に分泌されるから、方向づけられた該タンパク質は非常に容易に周囲の培地から単離され得る。細胞内産生の場合に必要な細胞の破壊を不要とし得る。

【0019】しかしながら、植物液胞のためのそのような標的性シグナルを同定し、単独で分離させることは、これまで可能ではなかった。

【0020】酵母のN末端標的性シグナルに匹敵するシグナルが液胞にタンパク質を方向づけるのに植物において関与し得ると仮定して、タグエおよびクリスピールズ

はエンドウからの植物性血球凝集素分子の種々の部分をリポーター遺伝子と連結し、そしてそれらを酵母内で試験した〔68〕。酵母宿主において、植物性血球凝集素の場合にも、分子のN末端部分が液胞のための標的性シグナルとして作用することが見出された。

【0021】その他の液胞タンパク質、塩基性β-1, 3-グルカナーゼは分子が成熟する際に失われるC末端範囲とともに合成される。同様のことがイネ、大麦および小麦（小麦胚凝集素）からのレクチンにも当てはまる。この範囲の機能はこれまで知られていなかった。

【0022】液胞からの種々のタンパク質のC末端の比較はこの領域で明らかな相同性をこれまで示さなかったから、これまで支持されてきた仮説は、酵母の場合と同様に、植物における決定的なシグナル活性はそれらの液胞タンパク質のN末端に由来するというものだった。

【0023】

【発明が解決しようとする課題】それ故に、本発明の範囲内で解決されるべき主な課題の一つは、結合されたタンパク質分子を植物細胞の液胞に特異的に方向づけるのに関連するペプチド断片（標的性配列）および該ペプチド断片をコードするDNA配列を同定し、そして単離することである。

【0024】

【課題を解決するための手段】驚くべきことに、本発明の範囲内で、いくつかが公知である操作を用いることによりこの課題を解決できることが今可能となった。

【0025】詳しくは、本発明は、あらゆる所望の結合されたタンパク質分子を特異的に植物液胞内に方向づける（標的として導く）のに関連する短いペプチド断片、および該ペプチド断片をコードするDNA配列に関する。上記結合されたタンパク質分子は使用された標的性配列に関して同種または異種起源のタンパク質であってよい。

【0026】液胞に本来存在するタンパク質分子のC末端領域から得られ、かつあらゆる所望のタンパク質分子と結合して、該分子が植物液胞内に標的指向様式で方向づけられることを導く短いペプチド断片が好ましい。該ペプチド断片をコードし、そして液胞に本来存在するタンパク質分子をコードする相当遺伝子の3'末端領域から対応して得られるDNAもまた好ましい。

【0027】液胞内に本来存在するキチナーゼ分子のC末端領域から得られ、かつあらゆる所望のタンパク質分子と結合して、該分子が植物液胞内に標的指向様式で方向づけられることを導く短いペプチド断片、および該ペプチド断片をコードし、そして植物キチナーゼ遺伝子の3'末端領域から対応して得られるDNAが特に好ましい。

【0028】植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、かつ以下の配列番号：1および2：

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met

で示されるアミノ酸配列を有するペプチド断片、および該ペプチド断片をコードしそして以下の配列番号：1：
CGN/AGR TCN/AGW TTY GGN AAY GGN CTN/TTR TTR/CTN GT N GAY ACN ATG TAA

（ただし、NはAまたはGまたはCまたはT/Uであり、RはGまたはAであり、WはAまたはT/Uであり、そしてYはT/UまたはCである）で示されるヌクレオチド配列を有するDNA配列がとりわけ好ましい。

【0029】大部分が植物により優先的に使用されるコドンからなるDNA配列が好ましい。

【0030】実質的に純粋な形態にあり、ニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425 (Nicotiana tabacum L. c.v. Havana 425) 植物の塩基性キチナーゼ遺伝子の3'末端 (C末端範囲) から得られ、そして以下の配列番号：2：

AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTCGAT ACT ATG TAA

で示されるDNA配列を実質的に有するDNA配列が特に好ましい。

【0031】実質的に純粋な形態にあり、ニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425植物の塩基性グルカナーゼ遺伝子の3'末端 (C末端範囲) から得られ、そして以下の配列番号：12：

GTC TCT GGT GGA GTT TGG GAC AGT TCA GTT GAA ACT AA T GCT ACT GCT TCT CTCGTA AGT GAG ATG TGA

で示されるDNA配列を実質的に有するDNA配列が特に好ましい。

【0032】上記DNA配列によりコードされるペプチド断片は、植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、かつ以下の配列番号：12：

Val Ser Gly Gly Val Trp Asp Ser Ser Val Glu Thr Asn Ala Thr Ala Ser LeuVal Ser Glu Met

で示されるアミノ酸配列を有するが、該ペプチド断片もまた本発明に包含される。

【0033】上記のDNA配列に実質的に相同であり、そして本発明に必須の特性を依然有する、すなわち植物液胞のための標的性シグナルとして作用するC末端ペプチドをコードするDNA配列の全ての誘導体もまた包含される。

【0034】本発明の範囲内で、あるDNA配列の活性部分の少なくとも60%、好ましくは少なくとも80%そして特に好ましくは少なくとも90%が第2のDNA配列と相同である場合に、それらは実質的に相同である。

【0035】本発明に係るDNA配列の上記誘導体は自然に生じる変種もしくは突然変異体であっても、または特にそれらは公知突然変異方法により特異的に製造され得る変種もしくは突然変異体であってもよい。

【0036】突然変異は本明細書において、1個またはそれ以上の塩基の欠失または挿入、そして1個またはそ

れ以上の塩基の置換、またはこれらの組合せを意味するものと理解されるべきである。上記塩基置換がアミノ酸置換を生じないサイレント突然変異により達成されるのが特別な場合である。

【0037】これもまた本発明に包含されるそのような突然変異の例は、下のDNA配列にまとめられ、そして配列番号：3ないし7で示されている。これらの突然変異体は配列番号：1および2で示される親配列からオリゴヌクレオチド仲介突然変異誘発により創成され得、そしてこの親配列によりコードされた断片と同様の標的特性を依然有するペプチド断片をコードする：

(a) GGA AAA GAT CTT TTA GTCGAT
ACT ATG TAA

(b) GGA AAT GGA CTT TTA GTCAAT
ACT ATG TAA

(c) GGA AAT GGA CTT TTA GTCCGT
ACT ATG TAA

(d) A GAT CTT TTG GGA AAT GGA CTTTGA GTC GAT
ACT ATG TAA

(e) ATC GGT GAT CTT TTA GTCGAT
ACT ATG TAA

配列(a)ないし(c)中の空白のスペースは標的性配列に比較して相違しない突然変異標的性配列の領域に関する。

【0038】上記のDNA配列によりコードされ、かつ配列番号：1および2で示される親配列によりコードされた天然に生じる未変性のペプチド断片と同様の標的特性を依然有するペプチド断片もまた本発明に包含される。

【0039】植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、そして配列番号：3ないし7で示されるアミノ酸配列を有するペプチド断片が特に好ましい：

(a) Gly Lys Asp Leu Leu Val Asp Thr
Met End

(b) Gly Asn Gly Leu Leu Val Asn Thr
Met End

(c) Gly Asn Gly Leu Leu Val Arg Thr
Met End

(d) Asp Leu Leu Gly Asn Gly Leu LeuVal Asp Thr
Met End

(e) Ile Gly Asp Leu LeuVal Asp Thr
Met End

配列(a)ないし(c)中の空白のスペースは出発配列に比較して相違しない突然変異標的性配列の領域に関する。

【0040】例として挙げたこのリストは何ら限定を意図するものでなく、本発明に必須である配列の特性が失われることなしに、上記配列の変種が当業者により非常に容易に創成され得ることを単に示すものである。

【0041】本発明はまた、上で詳細に記載されたDN

A配列から、またはそれらのDNA配列の誘導体から得られ、かつ出発配列の特性を依然有する断片または部分配列を包含する。

【0042】本発明の範囲内で、配列番号：2の本発明のDNA配列から得られ、そして以下の配列番号：8および9で示されるヌクレオチド配列を実質的に有するDNA断片が特に好ましい：

CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

10 【0043】上記のDNA配列は、植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、そして以下の配列番号：8および9で示されるアミノ酸配列を有するペプチド断片をコードする：

Leu Leu Val Asp Thr Met End

Gly Leu Leu Val Asp Thr Met End

それ故に、本発明は上記のペプチド断片にも関する。

【0044】本発明はさらに、あらゆる所望の発現性DNAが本発明に係るDNA配列の一つ、ならびに植物細胞内で活性化発現シグナルおよび場合により3'および/または5'領域のその他のコード性配列および/または非コード性配列に操作可能に連結され、その結果植物宿主内で形質転換して、発現産物が特異的に植物液胞内に方向づけられるキメラ遺伝子構築物からなる組換えDNA分子に関する。

【0045】5'末端領域にある発現性DNAが、植物細胞内で機能し得るN末端シグナルペプチドをコードする配列を含むか、またはそのような配列に連結されていることが有利である。さらに、DNA分子は、全体として液胞中に入り込む能力の改善に寄与するペプチド断片、例えばスポラミンのN末端範囲にマツオカおよびナカムラにより発見されたペプチド断片〔35〕をコードする配列のその他の部位を含んでいてもよい。

【0046】本発明はまた、本発明に係る組換えDNA分子を含むクローニング、形質転換および発現ベクター、該ベクターで形質転換された宿主有機体を包含する。

【0047】本発明はさらに、本発明に係る組換えDNA分子を含み、かつ大腸菌(E. coli) およびアグロバクテリウム・チュメファシエンシス(Agrobacterium tumefaciens)の両方において安定に複製し得るいわゆるシャトルベクターまたは二元ベクターに関する。

【0048】宿主有機体の中で、上記組換えDNAで形質転換された植物プロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、接合子、胚、花粉および/または種子そして特に全体の、好ましくは稔性の植物体からなる群から選択される植物宿主が特に好ましい。全体の植物体は例えば本発明に係る組換えDNA分子で直接形質転換されるか、または予め形質転換されたプロトプラスト、細胞および/または組織から再生により得られる。

50 【0049】本発明に係る構築物の一つを含み、そして

発現された遺伝子産物が所望どおりに液胞に局在しているトランスジェニック植物、特に稔性のトランスジェニック植物が非常に好ましい。

【0050】本発明はまた、本発明に係る組換えDNA分子の一つを用いる直接形質転換により形成されるか、まかは予め形質転換されたプロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、接合子、胚、花粉および/または種子（これらに限定されない）から再生により得られるトランスジェニック植物の全ての増殖材料を包含する。

【0051】本発明の範囲内で、増殖材料は有性または無性で、そして試験管内または生体内で増殖され得るあらゆる植物材料を意味するものと理解されるべきであり、好ましくは、本発明に係るトランスジェニックから得られるプロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、胚珠、接合子、胚、花粉および/または種子である。本発明はまた、体細胞融合、遺伝的改変または突然変異選択により得られた植物から得られるものを包含する、上記植物の後代ならびにそれらの突然変異体および変種に関する。

【0052】本発明はさらに、

- (a) 本発明に係るDNA配列の一つの製造方法
- (b) あらゆる所望の発現性DNA配列と操作可能に連結した本発明に係る上記DNA配列（好ましくはこのDNA配列は植物発現シグナルの調節制御下にある）を含む本発明に係る組換えDNAの製造方法
- (c) 本発明に係る上記組換えDNA分子を含むクローニング、形質転換および/または発現ベクターの製造方法
- (d) 形質転換された宿主有機体、特に植物プロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、接合子、胚、花粉および/または種子そして特に全体の、好ましくは稔性の植物体からなる群から選択される植物宿主の製造方法
- (e) 形質転換された植物材料から出発する増殖材料の製造方法、特に有性および無性の後代の製造方法に関する。

【0053】本発明はまた、以下の工程：

- (a) まず最初に、液胞内に特異的に方向づけるのに関連するDNA配列を公知方法により、適当な供給源から単離するか、または合成し、
 - (b) 該DNA配列をあらゆる所望の発現性DNA配列の3'末端に操作可能な様式で挿入し、
 - (c) 生成した構築物を植物発現ベクター中に植物内で活性な発現シグナルの制御下にクローニングし、そして
 - (d) 該発現ベクターを植物宿主内に形質転換し、そしてその中で発現ベクターを発現させる、
- から実質的になる植物液胞内に発現産物を標的にむけて方向づける方法を包含する。

【0054】5'末端領域にある発現性DNAが、植物細胞内で機能し得るN末端シグナルペプチドをコードする配列を含むか、またはそのような配列に連結されてい

ることが有利である。さらに、DNA分子は、全体として液胞中に入り込む能力の改善に寄与するペプチド断片、例えばスポラミンのN末端範囲にマツオカおよびナカムラにより発見されたペプチド断片〔35〕をコードする配列のその他の部位を含んでいてもよい。

【0055】本発明の範囲内で行われた研究の間に、本発明に係るシグナル配列を失う場合に、本発明に係る標的性配列の一つを本来含み、かつそれ故に液胞内に通常方向づけられるタンパク質が細胞外空間に分泌されることが見出された。

【0056】それ故に、本発明はさらに、標的性配列を本来含み、そしてそれ故に植物液胞内に通常方向づけられる植物タンパク質を細胞外空間に送り出す方法であって、以下の工程：

- (a) 上記タンパク質をコードするDNA配列を単離し、
- (b) 特定の細胞区画への方向づけに関連するC末端にある標的性配列を読み枠から除去し、
- (c) 上記の変異させたDNA配列を適当な植物発現ベクター中にスプライシングし、そして
- (d) 生成した構築物を植物宿主内に形質転換する、から実質的になる上記方法に関する。

【0057】定義

以下の記載において組換えDNA技術および植物遺伝学において慣用である多くの用語が用いられている。発明の詳細な説明および特許請求の範囲、およびこれらの用語にあてられた範囲の明確な、そして首尾一貫した理解を確実にするために、以下に定義を記載する。

植物材料：培養液中でまたはそのまま生育可能な植物の部分、例えばプロトプラスト、細胞、カルス、組織、胚、植物器官、芽、種子等、および全体の植物。

植物細胞：プロトプラストおよび細胞壁からなる植物の構造的および生理学的単位。

プロトプラスト：植物細胞または植物組織から分離され、そして細胞クローンまたは全体の植物に再生する能力を有する細胞壁のない「裸の」植物細胞。

植物組織：構造的および機能的単位の形態に組織化された植物細胞の群。

植物器官：種々の組織、例えば根、莖、葉または胚から構成される構造的および機能的単位。

異種遺伝子またはDNA：特定の生成物をコードするか、または生物学的機能を遂行し、そして該遺伝子が挿入される種以外の種に由来するDNA配列；該DNA配列は外来遺伝子または外来DNAとも記載される。

相同遺伝子またはDNA：特定の生成物をコードするか、または生物学的機能を遂行し、そして該遺伝子が挿入される種と同一種に由来するDNA配列。

合成遺伝子またはDNA：特定の生成物をコードするか、または生物学的機能を遂行し、そして合成手段により製造されるDNA配列。

植物プロモーター：植物内であらゆる所望の相同または非相同DNA遺伝子配列の転写を確実にさせるDNA発現の制御配列であるが、前記遺伝子配列はそのようなプロモーターと操作可能に結合されている。

終結配列：転写工程の終了をシグナルで伝える転写単位の末端のDNA配列。

過産生植物プロモーター (OPP)：このOPPで形質転換されなかった宿主細胞において自然状態で観察されるよりも明らかに高い程度まで (RNAの形態またはポリペプチドの量で測定される)、操作可能に結合された機能遺伝子配列のトランスジェニック植物細胞内での発現を引き起し得る植物プロモーター。

3' / 5' 非翻訳領域：mRNAに転写されるけれどもポリペプチドに翻訳されないコード領域の上流 / 下流に位置するDNA部分。この領域は、調節配列例えばリボソーム結合部位 (5') またはポリアデニル化シグナル (3') を含む。

DNAクローニングベクター：適当な宿主細胞内に挿入されたDNAのクローニングに必要な全てのシグナル配列を含有するクローニングビヒクル、例えばプラスミドまたはバクテリオファージ。

DNA発現ベクター：適当な宿主細胞内に挿入されたDNAの発現に必要な全てのシグナル配列を含有するクローニングビヒクル、例えばプラスミドまたはバクテリオファージ。

DNAトランスファーベクター：適当な宿主細胞内への遺伝物質の挿入を可能にするトランスファービヒクル、例えばTiプラスミドまたはウイルスファージ。

トランスジェニック植物の突然変異体、変種：自然に、または公知方法例えば紫外線処理、突然変異誘発剤での処理その他を用いて人工的に作製され、そして本発明に必須である出発植物の特徴および特性を依然有するトランスジェニック植物の誘導体。

実質的に純粋なDNA配列：天然または非天然源から実質的に純粋な形態で単離されたDNA配列。そのような配列は天然系、例えば細菌、ウイルスまたは植物もしくは動物細胞中に存在していても、また合成DNAまたはcDNAの形態で利用されてもよい。実質的に純粋なDNA配列は挿入物として上記DNAを含むベクターの形態で一般に単離される。実質的に純粋とは、その他のDNA配列がほんの無視できる量で存在し、そして5%未満、好ましくは1%未満、そして特に好ましくは0.1%未満含有されることを意味する。そのような配列および該配列を含むベクターは一般に水溶液中に、すなわち緩衝液または慣用の培養基の一つの中に存在する。

【0058】本発明の範囲内で、あらゆる所望の結合された遺伝子産物を特異的に植物液胞内に方向づけるのに関連する短いペプチド断片をコードする実際のDNA配列を同定および単離することが今はじめて可能になった。本発明に係る上記DNA配列の単離のための出発材

料として、液胞に本来存在するタンパク質のcDNAおよび / またはゲノムDNAクローン、例えば植物キチナーゼまたはグルカナーゼクローンが特に好ましい。

【0059】それ故に、本発明は、液胞に本来存在するタンパク質分子をコードする遺伝子の3'末端領域から得られ、かつあらゆる所望の発現性DNAと操作可能と連結して、特異的に植物液胞内に方向づけられる遺伝子産物を生じる新規で実質的に純粋なDNA配列に特に関

10 【0060】本発明の範囲内で、植物キチナーゼ遺伝子の3'末端領域から得られるDNA配列が好ましい。同様に、植物グルカナーゼ遺伝子の3'末端領域から得られるDNA配列も好ましい。

【0061】適当な遺伝子、特にキチナーゼまたはグルカナーゼ遺伝子の単離のために、当業者には十分に公知の慣用の一般的方法により創生され得るゲノムまたはcDNA遺伝子ライブラリを出発材料として使用するのが好ましい。ゲノムまたはcDNA遺伝子ライブラリの基本的創生方法は、例えば、文献〔34〕に詳細に記載され、また植物系への導入およびそれらの方法の応用は、例えば文献〔39〕に記載されている。

【0062】ゲノムDNAおよびcDNAは種々の方法で入手され得る。ゲノムDNAは、例えば公知方法を用いて適当な細胞から抽出され、そして精製され得る。

【0063】本発明の特定の実施態様において、cDNAの作成のために、選択された細胞または組織から、しかし特に高いキチナーゼまたはグルカナーゼ濃度を有することが知られている細胞または組織から単離され得るmRNAが出発材料として一般的に使用される。単離されたmRNAは次に相当するcDNA作成のためのマトリックスとして逆転写において使用され得る。

【0064】cDNA作成のための出発材料として特に好ましいのは、適当な手段により予め刺激され高レベルでキチナーゼまたはグルカナーゼを産生する植物細胞もしくは組織またはその他の適当な植物材料である。これは、例えば培養された細胞もしくは組織またはその他の適当な植物材料を無ホルモン培地上に接種し、そして高キチナーゼまたはグルカナーゼレベルの誘導に十分な期間それらを培養することにより達成され得る。発明の範囲内で、文献〔33〕により提案された塩およびチアミン塩化水素濃度を含有する基本培地 (LS培地) が特に好ましい。

【0065】ポリ (A) RNAを単離する方法およびcDNAを作成する方法は当業者に公知であり、そして実施例において以下に詳細に記載されている。

【0066】抽出され、そして精製されたDNA調製物は次に引き続きクローニングのための断片に切断される。クローン化されるべきゲノムDNAまたはcDNAは、機械的切断または好ましくは適当な制限酵素での切断により、クローニングベクター内への挿入に適当な大

きさに断片化され得る。ゲノムおよび/またはcDNA 遺伝子ライブラリの創生のための一般的物質として既に使用されている適当なクローニングベクターは例えば、ファージベクター例えば入シャロンファージ、または細菌ベクター例えば大腸菌プラスミドpBR322を包含する。その他の適当なクローニングベクターは当業者に公知である。

【0067】上記方法で創生された遺伝子ライブラリから、キチナーゼまたはグルカナーゼ遺伝子またはそれらの部分を含む適当なクローンがスクリーニングプログラム、例えば適当なオリゴヌクレオチドプローブ（プローブ分子）を用いて同定され、そして次に単離され得る。種々の方法、例えば分別コロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーションが適当なクローンを同定するために利用可能である。特定の翻訳産物の同定に基づいた免疫学的検出方法が使用されてもよい。

【0068】プローブ分子として、例えば同一のキチナーゼまたはグルカナーゼ遺伝子または構造的に関連するキチナーゼまたはグルカナーゼ遺伝子から予め単離され、そして本発明に係るキチナーゼまたはグルカナーゼ遺伝子内の配列の相当する部分とハイブリダイゼーションし得るDNA断片が使用され得る。

【0069】単離されるべき遺伝子のアミノ酸配列または該配列の少なくとも一部が公知であれば、その配列情報に基づいて相当するDNA配列は引き出され得る。遺伝コードは縮重していることが知られているから、大部分の場合、異なるコドンが一つおよび同じアミノ酸のために使用され得る。結果として、いくつかの例外を別に、特定のアミノ酸配列が、互いに類似しているオリゴヌクレオチドの全体の系により一般にコード化され得る。しかしながら、オリゴヌクレオチドの系の一つだけが検索されている遺伝子内の相当する配列に実際に相当することを確認することに注意が払われなければならない。可能性のあるオリゴヌクレオチドの数を始めから制限するために、特定のコドンが真核細胞において実際に使用されている頻度を考慮する文献〔32〕に主張されたコドンの使用に関する規則が例えば適用され得る。

【0070】その情報に基づいて、プローブ分子をゲノムDNAまたはcDNAと上記方法の一つにおいてハイブリダイゼーションさせることにより、適当なクローンの同定および単離のためのプローブ分子として使用され得るオリゴヌクレオチド分子を引き出すことも可能である。

【0071】所望の遺伝子、例えばキチナーゼまたはグルカナーゼをコードする所望の遺伝子の検出を促進するために、上記のDNAプローブ分子が適当な容易に検出可能な群で標識され得る。本発明の範囲内で、検出可能な群は特に容易に同定可能な物理的または化学的特性を有するあらゆる物質として理解されるべきである。

【0072】そのような物質は特にイムノアッセイの分野で広く使用されており、そしてそれらの大部分は本発明において使用され得る。酵素的に活性な群、例えば酵素、酵素基質、補酵素および酵素阻害剤、および蛍光剤および発色剤、発色団および放射性同位元素、例えば³H、³⁵S、³²P、¹²⁵Iおよび¹⁴Cがこの点で特別な記載がなされ得る。これらの標識の容易な検出性は、一方で固有の物理的特性（例えば蛍光標識、発色団、放射性同位元素）、そして他方でそれらの反応および結合特性（例えば酵素、基質、補酵素、阻害剤）に基づいている。

【0073】高いキチナーゼまたはグルカナーゼレベルの産生のために誘導された組織または細胞から順に単離されるポリ(A)RNAから誘導された一本鎖cDNAがプローブ分子として適当である。

【0074】ハイブリダイゼーションに関する一般的な方法は、例えば文献〔34〕および〔22〕に記載されている。

【0075】プローブ分子とハイブリダイゼーションし得、そして上記の検出方法の一つにより同定され得る上記遺伝子ライブラリ内のそれらのクローンは、キチナーゼまたはグルカナーゼをコードする配列の範囲および性質を詳細にさらに決定するために次に分析され得る。

【0076】遺伝子、特にキチナーゼまたはグルカナーゼ遺伝子をクローニングする別の方法は発現ベクターからなる遺伝子ライブラリの創生に基づいている。その方法において、上記方法と同様に、ゲノムDNA、しかし好ましくはcDNAがキチナーゼまたはグルカナーゼを発現し得る細胞または組織からまず分離され、そして次に適当な発現ベクター内にスプライシングされる。そのようにして創生された遺伝子ライブラリは次いで適当な手段を用いて、好ましくは抗キチナーゼまたはグルカナーゼ抗体を用いてスクリーニングされ、そして挿入物として所望の遺伝子または少なくともその一部を含むクローンが選択され得る。

【0077】上記方法を用いて、あらゆる所望の構造遺伝子と操作可能に連結して、遺伝子産物の形質転換された植物材料の液胞への特異的な方向づけを導くDNA配列をC末端範囲に有する、液胞内に本来存在する遺伝子産物をコードする遺伝子、例えば植物キチナーゼまたはグルカナーゼ遺伝子、しかし特にタバコからの塩基性キチナーゼまたはグルカナーゼ遺伝子を単離することが可能である。

【0078】その他の特徴づけのために、上記のように精製および単離されたDNA配列を配列分析に供する。予め単離されたDNAを最初に適当な制限酵素により断片に切断し、そして次に適当なクローニングベクター、例えばM13ベクターmp18およびmp19内にクローン化する。配列決定は5'→3'方向に行われ、好ましくはサンガーのジデオキシヌクレオチド鎖停止法〔5

5) またはマキサムおよびギルパートの方法〔36〕が用いられる。配列決定におけるエラーを防止するために、同時に2本のDNA鎖の配列を決定することが有利である。ヌクレオチド配列および相当するアミノ酸配列の分析は適当な市販のコンピュータソフトウェア（例えばウイスコンシン大学のGCGソフトウェア）を用いて有利にコンピュータアシストされている。

【0079】公知の方法を用いて、本発明に係るDNA配列は次に、上記の方法で製造されたDNAクローンから、特にキチナーゼまたはグルカナーゼクローンから非

常に容易に単離され得る。
【0080】本発明の範囲内で、実質的に純粋な形態にあり、そして例えばニコチアナ・タバカム園芸品種ハバナ425植物の塩基性キチナーゼ遺伝子の3'末端(C末端範囲)から得られ、そして以下の配列番号: 2: AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACTATG TAA で示されるDNA配列を実質的に有するDNA配列が特に好ましい。

【0081】上に示されたDNA配列は、タンパク質分子と操作可能に連結して、液胞のための標的性シグナルとして作用し、そして以下の配列番号: 2: Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met で示されるアミノ酸配列を有するペプチド断片をコードする。本発明は上記ペプチド断片にも関する。

【0082】実質的に純粋な形態にあり、そして例えばニコチアナ・タバカム園芸品種ハバナ425植物の塩基性グルカナーゼ遺伝子の3'末端(C末端範囲)から得られ、そして以下の配列番号: 12:

GTC TCT GGT GGA GTT TGG GAC AGT TCA GTT GAA ACT AAT GCT ACT GCT TCT CTCGTA AGT GAG ATG TGA

で示されるDNA配列を実質的に有するDNA配列が特に好ましい。

【0083】上記DNA配列によりコードされるペプチド断片は、植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、かつ以下の配列番号: 12:

Val Ser Gly Gly Val Trp Asp Ser Ser Val Glu Thr Asn Ala Thr Ala Ser LeuVal Ser Glu Met

で示されるアミノ酸配列を有するが、該ペプチド断片もまた本発明に包含される。

【0084】このDNA配列は公知の塩基配列であり、適当なキチナーゼまたはグルカナーゼ遺伝子から各回新たに単離される必要はなく、もちろんいつでも化学的操作により非常に容易に合成され得る。短いDNAオリゴヌクレオチドの合成に適当な方法、例えばホスホトリエステル法またはホスフィット法は当業者には公知である。今日、多くのオリゴヌクレオチド合成は機械化され、そして自動化されており、そのため短いDNA断片は短時間で製造され得る。

【0085】同様のことが相当する標的性ペプチドのアミノ酸配列にも当てはまり、該配列は塩基配列から直接

誘導され得る。

【0086】それ故に、1個またはそれ以上の塩基対の欠失、挿入または置換による、上で非常に詳細に記載されたDNA配列の変種または突然変異体は容易に製造され得、そしてそれらの標的性配列としての適性が検査され得る。

【0087】本発明の範囲内には、突然変異誘発により自然に生じる出発配列から非常に容易に製造され得る非常に多数の配列が開示されている。

10 【0088】詳しくは、操作は、本発明に係るDNA配列の一つを含む遺伝子を最初に同定および単離することであってよい。適当なクローニングベクター内にスプライシングさせた後、上記遺伝子、特に3'末端の標的性配列は次に公知工程手段により変性され得る。特定の突然変異体を作成する特に適した方法はいわゆるオリゴヌクレオチド仲介突然変異誘発である。その方法において、野生型配列に実質的に相同であるけれども、個々のヌクレオチドにおいて相違する短いオリゴヌクレオチド断片が合成される。上記相違は1個またはそれ以上のヌクレオチドの挿入、欠失または置換であってよい。これら

20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000

らの突然変異された断片は次に一般的公知方法により野生型遺伝子の相同対と置換される。最終構築物は次いで、以下に詳細に記載されるように、適当な植物発現ベクターにクローン化され、そして植物内に形質転換され得る。
【0089】しかしながら、ある種のDNA断片の突然変異はまた、好ましくはポリメラーゼ鎖反応(PCR)を用いて行われ得る。この試験管内方法において、突然変異させるべきDNA断片の周辺領域に一般的に由来し、そして鎖特異的である化学的に合成されたオリゴヌクレオチドが使用される。適当な条件下で、オリゴヌクレオチドと変性により作成されたDNA単鎖上の相補的領域とのハイブリッド形成が起こる。この方法で作成された二本鎖領域は引き続きポリメラーゼ反応のためのプライマーとして使用される。この方法において、大腸菌からのRNAポリメラーゼの他に、好熱菌例えばテルムス・アクアティクス(Thermus aquaticus)からの熱安定性ポリメラーゼを使用してもよい。

【0090】それ故に、本発明は上に非常に詳しく記載した塩基配列に限定されず、1個またはそれ以上の塩基の欠失または挿入により、1個またはそれ以上の塩基の置換により作成され得、かつ出発配列の本発明に係る特性を依然有する上記DNA配列の全ての突然変異体および/または変種を包含する。

【0091】本発明の範囲内で、配列番号: 1および2で示される出発配列からオリゴヌクレオチド仲介突然変異誘発により創成され得、そして該出発配列によりコードされたペプチドと同様の標的性を依然有するペプチドをコードする以下の変種(配列番号: 3ないし7)が特に好ましい:

23

(a) GGA AAA GAT CTT TTA GTCGAT
ACT ATG TAA
(b) GGA AAT GGA CTT TTA GTCAAT
ACT ATG TAA
(c) GGA AAT GGA CTT TTA GTCCGT
ACT ATG TAA
(d) A GAT CTT TTG GGA AAT GGA CTTTAA GTC GAT
ACT ATG TAA
(e) ATC GGT GAT CTT TTA GTCGAT
ACT ATG TAA

配列 (a) ないし (c) 中の空白のスペースは出発配列に比較して相違しない突然変異標的性配列の領域に関する。

【0092】上記の方法で単離または製造され得る本発明に係るDNA配列は同様の機能を有する相同DNA配列を同定するために今使用され得る。例えば、これは最初にゲノムまたはcDNA遺伝子ライブラリーを作成し、そしてプローブ分子として本発明に係るDNA配列を用いて、前記プローブ分子とハイブリッド形成し得る相同DNA配列の存在を求めて前記ライブラリーを調べることにより行われる。本発明はまた、このような同様の機能を有する相同DNA配列の位置決定方法に関する。

【0093】上記のDNA配列によりコードされ、かつ配列番号：1および2で示される親配列によりコードされた天然に生じる未変性のペプチド断片と同様の標的特性を依然有するペプチド断片もまた本発明に包含される。

【0094】植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、そして配列番号：3ないし7で示されるアミノ酸配列を有するペプチド断片が特に好ましい：

(a) Gly Lys Asp Leu Leu Val Asp Thr
Met End
(b) Gly Asn Gly Leu Leu Val Asn Thr
Met End
(c) Gly Asn Gly Leu Leu Val Arg Thr
Met End
(d) Asp Leu Leu Gly Asn Gly Leu LeuVal Asp Thr
Met End
(e) Ile Gly Asp Leu LeuVal Asp Thr
Met End

配列 (a) ないし (c) 中の空白のスペースは出発配列に比較して相違しない突然変異標的性配列の領域に関する。

【0095】本発明はまた、上で詳細に記載されたDNA配列から、またはそれらのDNA配列の誘導体から得られ、かつ出発配列の特性を依然有する断片または部分配列を包含する。

【0096】本発明の範囲内で、本発明に係るDNA配列から得られ、そして以下の配列番号：8および9で示

24

されるヌクレオチド配列を実質的に有するDNA断片が特に好ましい：

CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

【0097】上記のDNA配列は、植物液胞のための標的性シグナルとして作用し、そして以下の配列番号：8および9で示されるアミノ酸配列を有するペプチド断片をコードする：

Leu Leu Val Asp Thr Met

10 Gly Leu Leu Val Asp Thr Met

それ故に、本発明は上記のペプチド断片にも関する。

【0098】本発明の範囲内で、それらに自然に結合された構造遺伝子を特異的に方向づけるのに関連する短いC末端ペプチドをコードする本発明の上で詳細に特徴づけられたDNA配列は異種遺伝子に連結した場合でさえもそれらの標的性機能を果たし得ることを示すことが今始めて可能になった。

【0099】本発明の特定の実施態様において、本発明に係るDNA配列は、上記の方法により、相当する3'末端配列を含まない異種遺伝子、好ましくは異種キチナーゼ遺伝子に操作可能な様式で連結し、そして植物宿主内に形質転換させる。植物液胞内に特異的に方向づけられる遺伝子産物は次に形質転換された植物宿主中に発現される。

【0100】詳しくは、最初にcDNA遺伝子ライブラリーが適当な植物材料から作成され、そして3'末端範囲を持たない適当なキチナーゼcDNAクローンが適当なプローブ分子を用いて前記遺伝子ライブラリーから単離される方法であってよい。cDNAクローンを適当なクローニングベクター内にスプライシングさせた後、前記クローンは、本発明に係るDNA標的性配列が異種キチナーゼ遺伝子に操作可能な様式で連結され得るように制限切断部位の挿入または欠失により変性され得る。最終構築物は次に適当な植物発現ベクター内にクローン化させ得、それにより植物内で活性な発現シグナルの調節制御下におかれる。この点での例として、CaMVウイルスの35Sプロモーターおよびその終結配列を含む植物発現ベクターpGY1を記載し得るが、これは本発明の対象を制限するものではない。もちろん、あらゆるその他の適当なベクターもまたこの点で使用され得る。

【0101】例えば、本発明に係る標的性配列との連結により、C末端シグナルペプチドを持たず、それ故に細胞外空間に通常分泌される、キュウリ由来の酸性キチナーゼを植物液胞内に特異的に方向づけることが可能である。

【0102】本発明はさらに、発現性DNA、特に構造遺伝子、好ましくは異種構造遺伝子の本発明に係るDNA配列および植物細胞内で活性な発現シグナル例えばプロモーターおよび終結配列、ならびに場合により3'および/または5'領域のその他のコード配列および/ま

たは非コード配列と操作可能に連結して含むキメラ組換えDNA分子の構築にも関する。

【0103】プロモーター配列と隣接するコード性DNA配列との間にリーダー配列を含むことはしばしば有利であり、そのリーダー配列の長さはプロモーター配列と本発明に係るDNA配列との距離が結合された構造遺伝子の発現のために最適な距離であるように選択される。

【0104】挿入されるべきDNA分子が、植物細胞内で機能し得るN末端シグナルペプチドをコードする配列を含むか、またはそのような配列に5'末端領域において連結されていることが有利である。さらに、DNA分子は、全体として液胞中に入り込む能力の改善に寄与するペプチド断片、例えばスプラミンのN末端範囲にマツオカおよびナカムラにより発見されたペプチド断片〔35〕をコードする配列のその他の部位を含んでいてもよい。

【0105】形質転換された植物細胞およびそれらから発生する組織、そして特に植物に保護作用、例えば病原体（例えば植物病原性菌類、バクテリア、ウイルスその他）に対する増加した耐性；化学物質〔例えば除草剤（例えばトリアジン、スルホニル尿素、イミダゾリノン、トリアゾールピリミジン、ピアラホス、グリホセートその他）、殺虫剤もしくはその他の殺生物剤〕に対する耐性；不利な環境要因（例えば暑さ、寒さ、風、不利な土壌条件、湿気、乾燥その他）に対する耐性を導く全ての遺伝子が本発明の方法における使用に特に適している。

【0106】本発明の範囲内で、植物病原体または寄生虫の防除に関連した構造遺伝子が特に言及され得る。

【0107】昆虫耐性は、例えば昆虫および／またはこれらの幼虫に対して毒性であるポリペプチド、例えばバチラス・スリンギエンシス(*Bacillus thuringiensis*)の結晶性タンパク質をコードしている遺伝子により付与され得る。

【0108】昆虫耐性を与える第二類のタンパク質はプロテアーゼインヒビターである。プロテアーゼインヒビターは植物貯蔵構造体の通常の構成要素である。ダイズから単離・精製されたボウマン-パーク(Bowman-Birk)プロテアーゼインヒビターは、テネプリオ幼虫の内蔵プロテアーゼを阻害することが示された〔3〕。ササゲトリプシンインヒビターをコードしている遺伝子は、文献〔23〕に記載されている。

【0109】本発明の範囲内で、その起源に関係なくあらゆる所望のプロテアーゼインヒビター（例えば非植物または純粋に合成起源のプロテアーゼインヒビター）を植物細胞内で機能し得るN末端シグナルペプチドおよび本発明に係るC末端標的性配列に操作可能に連結することにより、上記のあらゆるプロテアーゼインヒビターを使用することが今では可能である。結果として、そのように変性されたプロテアーゼインヒビターは液胞内に特

異的に方向づけられ、その場所でそれらは最適な様式で貯蔵され得る。

【0110】プロテアーゼインヒビターをコードしている遺伝子は、植物プロモーター、例えばCaMV35Sプロモーターのような構造的なプロモーターの制御下で適当なベクター内に導かれていてもよい。遺伝子、例えばダイズボウマン-パークプロテアーゼインヒビターのコード配列は、cDNAクローニング方法を用いて得ることができる。100個より少ないアミノ酸を有するプロテアーゼインヒビター、例えばリマメトリプシンインヒビターを得る方法は、それを合成することである。コード配列はアミノ酸配列のバックトランスレーションにより予測され得る。さらに、所望の特定のベクターに対して適当な制限部位は両端部に包含される。合成遺伝子は30ないし60塩基対の重複オリゴヌクレオチド断片を合成し、それらの断片にリン酸転移し、次に互いを連結し〔34〕、そして最後に適当なベクター内にクローン化することにより製造される。その挿入が正確な配向にあるクローンは、配列決定により同定され得る。プロトプラスト内への挿入のために、単離されたプラスミドDNAが使用され得る。

【0111】これに関連して、植物病原体自体の細胞壁の破壊を生じ得るか、またはその他の物質と一緒に相乗的に破壊を少なくとも補助する加水分解酵素が言及されるべきである。

【0112】多くの昆虫は、ラメラ層中のキチンミセルが基質内に埋め込まれているクチクラ骨格を有する。非常に多くの植物病原性菌類は、菌糸および孢子構造の欠くことのできない成分としてキチンを含有し、例えば担子菌類（黒穂菌およびサビ菌）および子のう菌類および不完全菌類〔アルテルナリア(*Alternaria*)およびビポラリス(*Bipolaris*)、エクセロフィラム・タルシカム(*Exophylum turcicum*)、コレトトリカム(*Colletotricum*)、グレオセルコスボラ(*Gleocercospora*)およびセルコスボラ(*Cercospora*)〕を包含する。キチナーゼは試験管内である種の病原体の菌糸体の増殖を阻害し得る。構造的に、または病原体侵入に応じてキチナーゼを発現する植物の器官または組織は、非常に多くの異なる菌類の攻撃から保護される。

【0113】植物内に本来存在する内因性キチナーゼは細胞外にあるか（酸性キチナーゼ）、または液胞内部に局在しており（塩基性キチナーゼ）、2つの別の操作が本発明の範囲内で考えられる。

【0114】一方で、液胞内に方向づけるのに関連するC末端の配列を欠いている酸性キチナーゼ遺伝子は、遺伝子産物が液胞を特異的に通過するように本発明に係るDNA配列を用いて変性され得、その場合それらは病原体の侵入に対する活性を自然に生じる内因性塩基性キチナーゼを補助することができる。

【0115】第2の変法において、液胞内に本来存在す

る塩基性キチナーゼ遺伝子のC末端範囲は遺伝子工学法により読み枠から除去されるか、または例えばC末端範囲の直前に停止コドン挿入することにより少なくとも不活性化される。結果として遺伝子産物は細胞内空間に分泌され、そこで病原体侵入と直接関与するようになる。

【0116】それ故に、本発明のその他の面は、液胞内に本来存在し、そして植物細胞内で活性な発現シグナルと操作可能に連結している構造遺伝子であって、該遺伝子に本来存在するの3'末端の標的性配列を欠失させるか、または不活性化させた構造遺伝子を含む組換えDNA分子に関する。植物宿主で形質転換して、これらの構造遺伝子は機能的C末端シグナル配列を含まず、それ故に植物の細胞外空間に分泌される発現産物を生じる。

【0117】植物細胞内で活性な発現シグナルと操作可能に連結している構造遺伝子であって、該遺伝子に本来存在するの3'末端の標的性配列が欠失されるか、または不活性化された塩基性キチナーゼ遺伝子を含み、それ故に、植物宿主で形質転換して、これらの構造遺伝子は機能的C末端シグナル配列を含まず、そのため植物の細胞外空間に分泌される発現産物を生じる組換えDNA分子が特に好ましい。

【0118】病原体に対する植物の保護機構において中心的な役割をおそらく演じるその他の酵素は β -1, 3-グルカナーゼであり、それ故に、この酵素を本発明に係るDNA配列と組合せて使用することは本発明の範囲内で好ましい。

【0119】それ故に、植物細胞内で活性な発現シグナルと操作可能に連結している構造遺伝子であって、該遺伝子に本来存在するの3'末端の標的性配列が欠失されるか、または不活性化された塩基性グルカナーゼ遺伝子を含み、それ故に、植物宿主で形質転換して、これらの構造遺伝子は機能的C末端シグナル配列を含まず、そのため植物の細胞外空間に分泌される発現産物を生じる組換えDNA分子が好ましい。

【0120】本発明はさらに、本発明に係る標的性配列のいわゆる溶菌ペプチドへの連結にも関する。これらは病原体の細胞膜に侵入するか、該膜を溶解するか、またはその別の様式で該膜に損傷を与え得る抗病原性を有する天然または合成ペプチドである。本発明の範囲内で使用され得る上記溶菌ペプチドの代表例は動物起源（昆虫を含む）または植物および微生物起源のものが知られており、例えば動物のデフェンシン、セルコピン、チオニンおよびメリチン、および昆虫のデフェンシン、マガイニン、アタシン、ジプテリン、サベシン、カエルリンおよびキセノプシン、およびそれらのハイブリッドである。種々の溶菌ペプチドのアミノ酸配列は以下の刊行物に記載されている：WO89/11291；WO86/04356；WO88/05826；US4810777；WO89/04371および文献〔4〕、〔5〕

および〔69〕。

【0121】用語の最も広い意味での溶菌ペプチドは、細胞膜に侵入するか、該膜を溶解するか、または該膜に損傷を与える能力が酵素活性に基づいている化合物、例えばリゾチームおよびホスホリパーゼであると理解されるべきである。

【0122】本発明の範囲内で、加水分解性および溶菌性ペプチドと、液胞内、適当である場合には細胞外空間への引き続く標的指向方向づけとの組合せ発現に関する。さらに、発現適用と外因性適用の相互の使用が考えられ、後者の目的には、この目的には慣用の助剤および/または添加剤と組み合わせた溶菌ペプチドが特に適している。

【0123】本発明に係るDNA配列はまた、植物細胞自体またはより高度なオーガナイゼーション単位、例えば組織、カルス、器官、胚または全体の植物の一部に望ましく有用な化合物の産生における可能な増加を生じさせるために理想的な様式で使用され得る。

【0124】本発明の範囲内で使用され得る遺伝子は、例えば、葉、種子、塊茎、根、茎その他における保存物質または貯蔵物質の増加した形成を導く遺伝子を包含する。トランスジェニック植物により産生され得る望ましい物質は、例えばタンパク質、デンプン、糖、アミノ酸、ビタミン、アルカロイド、フラビン、芳香剤および色素、脂肪その他を包含する。

【0125】薬学的に活性な物質、例えばある種のアルカロイド、ステロイド、ホルモン、免疫モジュレーターおよびその他の生理学的に活性な物質をコードする構造遺伝子もまた、本発明に係る調節DNA配列に結合され得る。

【0126】それ故に、本発明範囲内で考慮され得る遺伝子は公知遺伝子、例えば植物に特有の遺伝子、例えばトウモロコシからのゼイン遺伝子、オート麦からのアベニン遺伝子、イネからのグルテリン遺伝子等、哺乳類特有の遺伝子、例えばインシュリン遺伝子、ソマトスタチン遺伝子、インターロイキン遺伝子、t-PA-遺伝子等、または微生物起源の遺伝子、例えばNPTII遺伝子等ならびに合成遺伝子、例えばインシュリン遺伝子等を包含するが、しかしこれに限定されない。

【0127】有用でそして望ましい特性をコードする天然に生じる構造遺伝子を別にして、本発明の範囲内で、化学的方法または遺伝子操作方法を用いる特定の方法で予め変形した遺伝子を使用することも可能である。

【0128】さらに、本発明の広い概念はまた、化学合成により全体が製造される遺伝子も包含する。それ故に、本発明の範囲内で使用され得る遺伝子またはDNA配列は、本発明の範囲内で与えられた定義に従う、相同および異種遺伝子またはDNAおよび合成遺伝子またはDNAである。インシュリン遺伝子がこの点で合成遺伝子の例として記載され得る。

【0129】本発明の範囲内で使用され得るDNA配列は、ゲノムDNAから、cDNAから、または合成DNAから排他的に構築される得る。もう一つの可能性は、cDNAおよびゲノムDNAおよび/または合成DNAからなるハイブリッドDNA配列の構築である。

【0130】その場合、cDNAはゲノムDNAと同じ遺伝子から生じてもよく、またcDNAとゲノムDNAの両方が異なる遺伝子から生じてもよい。しかしながら、あらゆる場合において、ゲノムDNAおよび/またはcDNAは同一遺伝子または異なる遺伝子から個々に

各々製造されてもよい。

【0131】DNA配列が1以上の遺伝子の部分を含む場合には、これらの遺伝子は1種そして同一個体由来しても、または同一属の同一種もしくは様々な種の種々の株もしくは変種に属する種々の個体由来しても、また同一もしくは異なる分類学上の単位(門)の1以上の属に属する個体由来してもよい。

【0132】植物細胞中の上記構造遺伝子の発現を確実にするために、コード遺伝子配列は植物細胞内で機能し得る発現配列に操作可能な様式で最初に連結されることが有利である。

【0133】従って、本発明の範囲内のハイブリッド遺伝子構築物は、本発明に係るDNA配列に加えて、1種またはそれ以上の構造遺伝子ならびにプロモーターおよびターミネーター配列の両方および3'および5'非翻訳領域のその他の調節配列を包含する発現シグナルを含む。

【0134】コードDNA配列(構造遺伝子)の発現の誘導を引き起こし得るあらゆるプロモーターおよびあらゆるターミネーターをハイブリッド遺伝子配列の成分として使用し得る。植物または植物ウイルスの遺伝子由来する発現シグナルは特に適当である。適当なプロモーターおよびターミネーターの例は、カリフラワーモザイクウイルス遺伝子(CaMV)のもの、または記載した発現シグナルの特徴的な特性を依然有する相同DNA配列である。細菌の発現シグナル、特にアグロバクテリウム・チュメファシエンスのTiプラスミドからのノバリンシンターゼ遺伝子(nos)またはオクトピンシンターゼ遺伝子(ocs)もまた適当である。

【0135】CaMVゲノムの35Sおよび19S発現シグナルまたはそれらの相同物が本発明の範囲内で好ましく、例えば文献[34]に記載されるような分子生物学的方法を用いて前記ゲノムから単離され、そしてコードDNA配列に結合され得る。

【0136】35Sおよび19S発現シグナルの相同物は、本発明の範囲内で、わずかな配列の相違があっても実質的に出発配列と実質的に相同であり、そしてそれらの出発配列と同一の機能を依然有する配列を意味するものとして理解されるべきである。

【0137】本発明に従って、35S転写制御配列に使

用される出発材料は、例えば遺伝子地図[15]のヌクレオチド6808-7632を包含するCaMV“S”株のScaI断片であってよい。

【0138】19Sプロモーターおよび5'非翻訳領域は、CaMV遺伝子地図[25]のPstI部位(5386位)とHindIII部位(5850位)との間のゲノム断片上に位置する。相当するターミネーターおよび3'非翻訳領域は、CaMVゲノムの7342位と7643位との間のEcoRV/BglII断片上に位置する。

【0139】完全なヌクレオチド配列が文献[16]に記載されているCaMV CM1841株の発現シグナルが本発明の範囲内で好ましい。

【0140】使用し得る効果的な植物プロモーターのうち1つの例は、過産生植物プロモーターである。この種のプロモーターは、所望の遺伝子産物をコードする遺伝子配列に操作可能に連結されているならば、前記遺伝子配列の発現を仲介可能であるべきである。

【0141】本発明の範囲内で使用し得る過産生植物プロモーターは、ダイズからのリブローズ-1、5-ビスホスフェートカルボキシラーゼの小サブユニットのプロモーターおよびクロロフィルa/b結合タンパク質のプロモーターを包含する。これらの2種のプロモーターは、それらが真核植物細胞において光により誘導されるという事実で知られている(例えば、文献[9]参照)。

【0142】それ故に、本発明は、本発明に係るDNA配列が発現性DNAおよび植物細胞内で活性化発現シグナルならびに場合により3'および/または5'領域のその他のコード配列および/または非コード配列に操作可能に連結され、その結果植物宿主内で形質転換して、発現産物が特異的に植物液胞内に方向づけられるキメラ遺伝子構築物からなる組換えDNA分子に関する。

【0143】本発明に係るDNA配列が形質転換された植物細胞およびそれらから発生する組織、特に植物に、病原体、化学物質および不利な環境要因に対する保護作用を付与する構造遺伝子と操作可能に連結されているキメラ遺伝子構築物を含む組換えDNA分子が特に好ましい。

【0144】本発明に係るDNAが植物細胞内でキチナーゼ、特に酸性キチナーゼまたはグルカナーゼ、特に酸性グルカナーゼを発現する構造遺伝子と操作可能に結合されているキメラ遺伝子構築物を含む組換えDNA分子が本発明の範囲内でとりわけ好ましい。

【0145】本発明はまた、形質転換された植物細胞自体または組織、器官、カルス、胚および全体の植物からなる群から選択されるより高度なオーガナイゼーション単位の部分において発現して、望ましく有用な化合物の植物液胞内への方向づけを導く、構造遺伝子と本発明に係るDNA配列が操作可能に結合されているキメラ遺伝子構築物を含む組換えDNA分子を包含する。

【0146】液胞内に本来存在するタンパク質をコ

ードする遺伝子、特に塩基性キチナーゼ遺伝子、とりわけタバコまたはキュウリ植物体からの塩基性キチナーゼ遺伝子が、該タンパク質分子が細胞外空間に分泌されるように変性されたキメラ遺伝子構築物を含む組換えDNA分子はさらに好ましい。詳細には、このことは、前記遺伝子、特にキチナーゼ遺伝子に本来存在し、液胞内への方向づけに関連するDNA配列を含むC末端範囲の除去または不活性化を、遺伝子工学法を用いて、例えばC末端範囲の前に直接停止コドン挿入することにより行われ得る。

【0147】キメラ遺伝子の構築に使用され得るその他の調節DNA配列は、例えば誘導または抑制によって植物組織内で結合DNA配列の転写を制御し得る配列を包含する。

【0148】種々の内部および外部要因、例えば植物ホルモン、熱ショック、化学物質、病原体、酸素不足、光、その他により誘導されることが知られている個々の植物遺伝子が例として挙げられる。

【0149】植物ホルモンによる遺伝子調節の例として、ワタの後胚期に生じる過剰のmRNAを誘導することが知られているアブシジン酸(ABS)が言及されるべきである。その他の例は、ヒマの実におけるマレーンターゼ転写物および大麦の糊粉層における α -アミラーゼのイソ酵素を誘導するジベレリン酸(GA3)である。

【0150】マメの葉におけるグルカナーゼまたはグルカナーゼおよびキチナーゼまたはグルカナーゼの活性はストレスホルモンエチレンとの処理により著しく高められ得る。キチナーゼの場合、誘導作用はキチナーゼ遺伝子のプロモーターを介して制御され、そしてマメ〔ファセオルス・ヴァルガリス(Phaseolus vulgaris)〕のキチナーゼ遺伝子からのプロモーターを用いるリポーター遺伝子試験により、これを示すことが可能だった。

【0151】ダイズの熱ショック感受性タンパク質遺伝子の調節は詳細に研究されてきた。40℃の温度で数時間植物を処理すると、いわゆる熱ショックタンパク質の新たな合成を生じる。これまで非常に多くの遺伝子が単離され、そしてそれらの調節が詳細に分析された。それらの遺伝子の発現は転写段階で主として制御される。例えば、hps70遺伝子のプロモーターがネオマイシンホストトランスフェラーゼII(NPTII)遺伝子と融合される場合、その様にして形成されたキメラ遺伝子は熱ショックにより誘導され得る〔67〕。

【0152】植物内に誘導可能な遺伝子のもう一つのクラスは、光調節化遺伝子、特にリブ羅斯1、5-ビスホスフェートカルボキシラーゼ(RUBISCO)の小サブユニットの核コード化遺伝子からなる。文献〔41〕は、リポーター遺伝子がエンドウからのRUBISCO遺伝子の5'-フランキンク配列にキメラの形態で連結される場合に、該5'-フランキンク配列がリポ-

ター遺伝子に光誘導性を導入し得ることを示した。この観察をその他の光誘導化遺伝子、例えばクロロフィルa/b結合タンパク質に広げることも可能となった。

【0153】トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(adh遺伝子)が鋭意研究の対象だった。トウモロコシからadh1-s遺伝子が単離され、そして一時的に形質転換された組織が嫌気条件下に暴露されたとき5'-フランキンクDNAがキメラリポーター遺伝子(例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ,CAT)の発現を誘導し得ることが示された〔28〕。

【0154】制御可能なDNA配列のその他の群は化学的に制御可能な配列であり、それは例えばタバコのPR(病原体関連)タンパク質遺伝子内に存在し、そして化学調節剤により誘導され得る。

【0155】上に例示した調節性DNA配列は、天然起源または合成起源であってよく、また天然および合成DNA配列の混合物からなっていてよい。

【0156】発現性DNA、特に挿入されるべき構造遺伝子が、植物細胞内で機能し得るN末端シグナルペプチドをコードする配列を含むか、またはそのような配列に5'末端領域で連結されていることは有利である。シグナルペプチドは内膜系を介して輸送されるタンパク質のN末端に見出される輸送シグナルである。このシグナル配列は、上記タンパク質が最初に小胞体を通過し、そこでシグナルペプチドがその機能を果たすとすぐに前駆体タンパク質からタンパク質分解的に分離されることを可能にする。その特異的な機能のために、このタイプのシグナルペプチド配列は、バクテリア、酵母、菌類、動物または植物によらず全ての生存細胞において進化の間に高度に保存されてきた。

【0157】さらに、DNA分子は、全体として液胞中に入り込む能力の改善に寄与するペプチド断片、例えばスボラミンのN末端範囲にマツオカおよびナカムラにより発見されたペプチド断片〔35〕をコードする配列のその他の部位を含んでいてもよい。

【0158】それ故に、本発明は、本発明に係る標的性配列の他に、構造遺伝子またはあらゆるその他の発現性遺伝子、例えば遺伝子発現の特異的に制御される誘導または抑圧を可能にするDNA配列のその他の制御部位を操作可能に連結されて含むキメラ遺伝子構築物を包含する。

【0159】配列の種々の部位はそれ自体公知の方法により互いに連結されて、植物細胞内で発現可能な完全なDNA配列を形成する。適当な方法は、例えば相同部位を有するDNA配列の生体内組換えおよび制限断片の試験管内連結を包含する。

【0160】一般的に使用されるクローニングベクターは宿主細胞に適合する種起源の、複製および制御配列を有するプラスミドまたはウイルス(バクテリオファ-

ジ) ベクターである。

【0161】クローニングベクターは一般的に、一つの複製開始点、そしてさらに形質転換された宿主細胞内で表現型の選択特性、特に抗生物質またはある種の除草剤に対する耐性を導く特有の遺伝子を有する。宿主細胞内で形質転換後、形質転換されたベクターはこれらの表現型マーカーにより選択され得る。

【0162】本発明の範囲内で使用され得る選択可能な表現型マーカーは、例えばこれが本発明の主題を限定することなくアンピシリン、テトラサイクリン、ハイグロマイシン、カナマイシン、メトトレキサート、G418およびネオマイシンに対する耐性を包含する。

【0163】本発明の範囲内の適当な宿主細胞は、原核生物であり、細菌宿主、例えばアグロバクテリウム・チュメファシエンス(*A. tumefaciens*)、大腸菌(*E. coli*)、エス・チフィムリウム(*S. typhimurium*)およびセラチア・マルセッセンス(*Serratia marcescens*)およびシアノバクテリアを含む。真核生物宿主、例えば酵母、菌糸体形成菌および植物細胞も本発明の範囲内で使用できる。

【0164】本発明に係るハイブリッド遺伝子構築物の適当なクローニングベクター内へのスプライシングは、例えば文献〔34〕に記載された標準法を用いて行われる。

【0165】一般的に、スプライシングされるべきベクターおよびDNA配列をまず最初に適当な制限酵素で切断する。適当な制限酵素は、例えばプラント末端を有する断片を生じるもの、例えばSma I、Hpa IおよびEcoRV、または粘着端を形成する酵素、例えばEcoRI、Sac IおよびBamHIである。

【0166】プラント末端を有する断片と互いに相補的である粘着端を有する断片の両方を、適当なDNAリガーゼにより再び連結し、連続的で均一なDNA分子を形成することができる。

【0167】突出する粘着端を有するDNA断片を大腸菌DNAポリメラーゼのクレノウ断片と処理して、相当する相補的ヌクレオチドで空隙を充填することによりプラント末端を製造することもできる。

【0168】他方、例えば、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて所望のDNA配列および切断されたベクター分子の端部に相補的ホモポリマー尾部を添加するか、または制限切断部位を有する合成オリゴヌクレオチド配列(リンカー)を添加し、そして次に適当な酵素で切断することにより、粘着端を人工的に製造することもできる。

【0169】本発明の範囲内で、キチナーゼ突然変異体の構築において、使用されるキチナーゼクロンの種々の部分は互いに連結される。この目的を達成し得るために、それらの部分は類似していなければならず、すなわち、適当な制限切断部位は種々の配列中に導入されな

ばならない。それ故に、本発明の特定の実施態様において、以下の示した制限切断部位が好ましくは使用され、それらは全て同一粘着端を導く：

BamHI [G/GATCC]

BclI [T/GATCA]

BglIII [A/GATCT]

読み枠は、GATがアスパラギン酸のコドンとして機能するように各々の場合において選択されるのが好ましい。

10 【0170】クローニングベクターおよび該ベクターで形質転換された宿主細胞は、一般にベクターのコピー数を増やすために使用される。増加したコピー数によって、ハイブッド遺伝子構築物を有するベクターを単離すること、そして例えばキメラ遺伝子配列を植物細胞内に挿入するために前記ベクターを使用することが可能となる。

20 【0171】その他の操作段階において、所望の遺伝子産物をコードする構造遺伝子または制御機能を有する非コードDNA配列、例えばアンチセンスDNAを植物細胞内に挿入し、そして場合によってはそれを植物ゲノム内に組み込むために上記プラスミドを使用することができる。

【0172】本発明はそれ故に、構造遺伝子またはその他の望ましい遺伝子または遺伝子断片またはそれらのゲノム内に含まれるその他の有用なDNA配列を含む受容性植物細胞の作成にも関する。

【0173】キメラ遺伝子構築物の挿入は公知の遺伝子導入方法を用いて植物プロトプラスト中で行われるのが好ましい。

30 【0174】多くの非常に有効な方法が植物細胞中にDNAを導くために存在しており、該方法は遺伝子導入ベクターの使用または直接遺伝子導入方法に基づいている。

【0175】一つの可能な方法は、例えば植物細胞をウイルスまたはアグロバクテリウムと接触させることからなる。これは、感受性植物細胞を感染させるか、または該植物細胞から誘導されたプロトプラストを共培養することにより達成され得る。本発明の範囲内でカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)が植物内への本発明に係るキメラ遺伝子構築物の挿入のためのベクターとして使用されてもよい。CaMVの全ウイルスDNAゲノムが細菌親プラスミド内に組み込まれ、細菌中で増殖され得る組換えDNA分子を形成する。クローニングが行われた後、組換えプラスミドは制限酵素を用いて無作為にまたは該組換えプラスミドのウイルス部分、例えばアフィドによりウイルスの移動性をコードする遺伝子内の非常に特異的な非必須部位で切断し、そしてハイブリッド遺伝子構築物が切断部位中にクローン化される。

50 【0176】単一の特定の制限認識部位を有する小さいオリゴヌクレオチド、いわゆるリンカーもまた組み込ま

れ得る。そのようにして変形された組換えプラスミドは再びクローン化され、そしてハイブリッド遺伝子構築物をたった一度出現する制限部位中にスプライシングさせることによりさらに変形される。

【0177】組換えプラスミドの変形ウイルス部分は次いで細菌の親プラスミドから切り出され、そして植物細胞または全体の植物の接種のために使用される。

【0178】キメラ遺伝子構築物を細胞中に挿入するもう一つの方法は、該遺伝子構築物を用いて形質転換されたアグロバクテリウム・チュメファシエンスおよび/またはアグロバクテリウム・リゾゲネスでの植物細胞の感染を利用する。トランスジェニック植物細胞は次に当業者には公知の適当な培養条件下で培養され、その結果それらは苗条および根を形成し、そして全体の植物が最終的に形成される。

【0179】植物材料を形質転換するもう一つの可能な方法は、文献〔48〕にニンジンの形質転換のために記載されたように、アグロバクテリウム・リゾゲネスおよび形質転換されたアグロバクテリウム・チュメファシエンスの両方を用いる混合感染からなる。混合比率は、アグロバクテリウム・リゾゲネスの形質転換に基づいて形成された根コロニーが高比率のアグロバクテリウム・チュメファシエンスT_iプラスミドを含むようであればならない。このことは、例えば、アグロバクテリウム・リゾゲネスおよびアグロバクテリウム・チュメファシエンスと一緒に植物材料に公知方法により混合比率1:1ないし1:100で、好ましくは1:10で適用することにより達成され得る。トランスジェニック植物は次に当業者には公知の適当な培養条件下で培養され、その結果それらは苗条および根を形成し、そして全体の植物が最終的に形成される。2つのアグロバクテリウム種は、形質転換されるべき植物材料の実際の接種直前に混合されるのが有利である。

【0180】本発明に係るキメラ遺伝子構築物は、それ故に、例えばアグロバクテリウム・チュメファシエンスのT_iプラスミドまたはアグロバクテリウム・リゾゲネスのR_iプラスミドにより適当な植物細胞内に形質転換され得る。T_iプラスミドまたはR_iプラスミドはアグロバクテリウムによる感染を介して植物に導入され、そして適当な様式で植物ゲノム内に組み込まれる。

【0181】T_iプラスミドおよびR_iプラスミドの両方は形質転換された細胞の産生に必須である2つの領域を有する。それらの領域の1つ、トランスファーDNA (T-DNA) 領域は植物に導入され、そして腫瘍の誘導を導く。その他の領域、毒性付与(vir)領域は、腫瘍の維持のためでなく、腫瘍形成のためにだけ必要である。トランスファーDNA領域の大きさは移動性を損傷することなくキメラ遺伝子構築物の組み込みにより大型化され得る。腫瘍誘導遺伝子を除去し、そして選択性マーカーを組み込むことにより、変形されたT_iプラス

ミドまたはR_iプラスミドは適当な植物細胞内への本発明に係る遺伝子構築物の導入のためのベクターとして使用される得る。

【0182】vir領域は、T-DNA領域およびvir領域が同一アグロバクテリウム細胞内の同一ベクターに存在するか、または異なるベクターに存在するかに関係なく植物細胞のゲノムに、アグロバクテリウムのT-DNAの導入を引き起こす。染色体上のvir領域はまた、ベクターから植物細胞へのT-DNAの移動を誘導する。

【0183】それ故に本発明の範囲内で、植物細胞内にアグロバクテリウムのT-DNA領域を導入するための系が好ましく使用されるが、該系においてvir領域およびT-DNA領域は異なるベクターに位置している。そのような系は「二元ベクター系」として知られており、そしてT-DNAを含むベクターは「二元ベクター」と呼ばれる。

【0184】植物細胞内に形質転換され得、そして形質転換された細胞の選択を可能にするあらゆるT-DNA含有ベクターは本発明の範囲内での使用に適している。

【0185】左側境界配列(LB)と右側境界配列(RB)との間にクローン化された本発明に係るキメラ遺伝子構築物を含み、そして大腸菌およびアグロバクテリウム・チュメファシエンスの両方で安定に複製可能であるシャトルベクターが本発明の範囲内で特に好ましい。

【0186】新規に開発された形質転換技術を用いて、アグロバクテリウムの天然の宿主植物でない植物種を試験管内で形質転換することが可能となった。例えば、単子葉植物、特に穀類の種および種々のグラス類はアグロバクテリウムの天然の宿主ではない。

【0187】単子葉類はアグロバクテリウムを用いて形質転換され得ることが徐々に明らかになってきており、その結果、現在利用可能である新規実験方式を用いて、穀類およびグラス類の種もまた形質転換されやすい〔20〕。

【0188】アグロバクテリウムを用いるいわゆる葉ディスク形質転換〔27〕が本発明の範囲内で好ましい。適当な標的植物からの滅菌葉ディスクを本発明に係るキメラ遺伝子構築物の一つを含有するアグロバクテリウム細胞と培養し、そして次に適当な栄養培地中または該培地上に移す。それ故に、本発明の範囲内では、寒天の添加により固化され、そして慣用の植物生長調節剤、特にα-ナフト酢酸、ピクロラム、2, 4, 5-トリクロロフェノキシ酢酸、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸、インドール-3-酪酸、インドール-3-乳酸、インドール-3-コハク酸、インドール-3-酢酸およびp-クロロフェノキシ酢酸からなるオーキシンの群、カイネチン、6-ベンジルアデニン、2-イソペンテニルアデニンおよびゼアチンからなるサイトカイニンの群から選択されるもの1種またはそれ以上で富化されたLS培地が

特に適当である。オーキシンおよびサイトカイニンの好ましい濃度は0.1mg/lないし10mg/lの範囲内である。

【0189】20℃ないし40℃、好ましくは23℃ないし35℃、特に25℃の温度および散光下で、数日間、しかし好ましくは2ないし3日間の培養後、葉ディスクを苗条誘導のために適当な培地に移す。選択物質が添加され、オーキシンを含有せずにサイトカイニンを含むLS培地が特に好ましい。培養物は光の中に保持され、適当な間隔で、しかし好ましくは1週間の間隔で新鮮培地に移される。発生する未熟苗条が切り取られ、そして苗条を誘導する培地中でさらに培養されて根を形成する。本発明の範囲内では、オーキシンまたはサイトカイニンを含有しないが、形質転換体の選択のための選択物質を含有するLS培地が特に好ましい。

【0190】アグロバクテリウム仲介形質転換の他に、本発明の範囲内では、植物材料内に本発明に係る遺伝子構築物を挿入するための直接形質転換法を用いることも可能である。

【0191】例えば、ベクター内に包含された遺伝物質は、純粋な物理的方法、例えば細く引き伸ばされたマイクロピペットを用いるマイクロインジェクション〔45〕または形質転換性DNAで被覆されているマイクロプロジェクトイル(microprojectile)での細胞の砲撃〔71〕により、植物細胞内に直接挿入され得る。

【0192】植物細胞内への遺伝物質の直接導入のその他の可能な方法は、原形質膜を変性する操作、例えばポリエチレングリコール処理、熱ショック処理もしくはエレクトロポレーションまたはそれらの組合せ〔59〕を用いるプロトプラストの処理からなる。

【0193】エレクトロポレーション技術において、植物プロトプラストはハイブリッド遺伝子構築物を含むプラスミドと共に高電圧の電気パルスに晒される。これは生体膜の透過性に可逆的増加をもたらし、そしてプラスミドの挿入を可能にする。エレクトロポレーションされた植物プロトプラストはそれらの細胞壁を新たに作り、分化し、そしてカルス組織を形成する。形質転換された植物細胞の選択は上記の表現型マーカーを用いて行われ得る。

【0194】植物細胞への遺伝物質の直接導入のその他の方法は、純粋に化学的な方法に基づき、形質転換が非常に効率良くそして迅速に行われることを可能にするものであり、文献〔44〕や〔19〕に記載されている。

【0195】共形質転換を用いる直接遺伝子導入〔57〕もまた植物材料の形質転換に適当である。

【0196】共形質転換は植物ゲノム内への種々のDNA分子(非選択性および選択性遺伝子)の同時取り込みおよび組み込みに基づいており、そしてそれ故に非選択性遺伝子で形質転換された細胞の検出を可能にする方法である。

【0197】例として上に挙げた可能な形質転換法のリストは完全であると主張するものでなく、そして本発明の対象をなんら制限するものでもない。

【0198】それらのゲノム内に組み込まれたハイブリッド遺伝子構築物を含む細胞クローンは通常の選択、スクリーニングおよび検出を用いて選択され、そしてトランスジェニック植物の再生のために使用される。

【0199】全体の植物を形成するために培養液中に保持されたプロトプラストの再生は、例えば文献〔50〕に記載されている。

【0200】再生方法は植物の種によって異なる。しかしながら、一般的に、公知の培養培地の一つにおいてプロトプラストが分化しそして細胞壁を形成するように刺激される。特定の活性剤、例えばオーキシンおよびサイトカイニンとの処理により根または苗条を形成するように誘導され得るカルス培養物が最終的に形成される。

【0201】そのようにして得られた小植物は土壌に移され、そして通常の実生と同様にさらに栽培され得る。

【0202】効率的な再生は培地、遺伝子型およびこれまでの培養歴に特に依存する。これらの3つの変数が適当に制御される場合、再生は完全に再現および反復可能である。

【0203】植物ゲノムの組み込み成分として上記のハイブリッド遺伝子構築物の植物細胞内で発現可能な構造遺伝子を含む再生されたトランスジェニック植物は、好ましくは滅菌苗条培養体の形態で、活発に増殖させることができる。

【0204】再生されたトランスジェニック植物の植物ゲノム内への操作上の発現性遺伝子の安定な組み込みは、組み込まれた遺伝子の有糸分裂安定性との関係により、そして有糸分裂の間のメンデル形質としてのふるまいに基づいて、さらにサザンブロット分析〔66〕を用いて変更される。

【0205】それ故に本発明の広い概念は、上記方法により形質転換され、そして発現可能な形態で本発明に係る組換えDNAを含むプロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、種子、胚、花粉、胚珠、接合子および全体の植物、特に全体の稔性植物からなる群から選択されるトランスジェニック植物材料ならびに該トランスジェニック植物材料の製造方法を包含する。

【0206】植物液胞内に特異的に方向づけられる遺伝子産物を含む形質転換された植物材料の作出方法は以下の工程：

(a) まず最初に、液胞内に特異的に方向づけるのに関連するDNA配列を公知方法により、適当な供給源から単離するか、または合成し、

(b) 該DNA配列をあらゆる所望の発現性DNA配列の3'末端に操作可能な

様式で挿入し、

(c) 生成した構築物を植物発現ベクター中に植物内で

活性な発現シグナルの制御下にクローニングし、そして
(d) 該発現ベクターを植物材料内に公知方法により形質転換し、そしてその中で発現ベクターを発現させる、から実質的になる。

【0207】上記DNAがN末端シグナルペプチドを本来コードする構造遺伝子でないならば、発現されるべきDNAの5'末端領域に前記シグナルペプチドをコードするDNA配列をさらに操作可能に挿入することは有利である。

【0208】以下の工程：

(a) 上記タンパク質をコードするDNA配列を単離し、

(b) 特定の細胞区画への方向づけに関連するC末端にある標的性配列を読み枠から除去し、

(c) 上記の変異させたDNA配列を適当な植物発現ベクター中にスプライシングし、そして

(d) 生成した構築物を植物材料内に形質転換する、から実質的になる、細胞外空間に特異的に筆される遺伝子産物を含む形質転換された植物材料の作出方法もまた本発明は包含する。

【0209】本発明の範囲内で、プロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、種子、胚、花粉、胚珠、接合子および全体の植物、その他からなる群から選択される植物材料から再生され得、そして本発明に係る組換えDNA分子の一つを含む、それらの有性および無性の後代を包含するトランスジェニック植物が好ましい。

【0210】野生型に比べ植物液胞および/または細胞外空間内に著しく増加されたタンパク質含量を有する、トランスジェニック植物ならびにその有性および無性の後代が好ましい。

【0211】野生型に比べ植物液胞内に著しく増加されたキチナーゼ含量を有する、トランスジェニック植物ならびにその有性および無性の後代が特に好ましい。

【0212】野生型に比べ植物液胞内に著しく増加されたグルカナーゼ含量を有する、トランスジェニック植物ならびにその有性および無性の後代が特に好ましい。

【0213】「トランスジェニック植物の無性および/または有性の後代」という本発明の範囲内で定義されたような表現はそれ故に、公知方法、例えば細胞融合または突然変異選択により得られ、そして形質転換された出発植物体の特徴的な特性を依然有するあらゆる突然変異体および変種を含み、そして形質転換された植物材料を用いて得られる全てのハイブリッド形成体および融合産生物をも包含する。

【0214】本発明はまた、トランスジェニック植物の増殖材料に関する。本発明の範囲内で、トランスジェニック植物の増殖材料とは、生体内または試験管内で有性的にまたは無性的に増殖され得るあらゆる植物材料であると理解されるべきである。本発明の範囲内で特に好ましいとみなされるべきである植物増殖材料は、特にプロ

トプラスト、細胞、カルス、組織、器官、種子、胚、花粉、胚珠および接合子、ならびにトランスジェニック植物から得ることができるあらゆるその他の増殖材料である。

【0215】本発明はまた植物の部分、例えば本発明の方法を用いて予め形質転換され、それ故に少なくとも一部はトランスジェニック細胞からなるトランスジェニック植物またはそれらの後代から生じる花、茎、果実、葉および根にも関する。

10 【0216】本発明の方法は、全ての植物、特に被子植物亜門および裸子植物亜門の体系的な群に属するものの形質転換に適當である。裸子植物亜門の中では球果植物綱の植物が特に興味深い。

【0217】被子植物亜門の中では落葉樹および灌木に加えて、ナス科、ジュウジバナ科、キク科、ユリ科、ブドウ科、アカザ科、マツカゼソウ科、アリアセア工科、ヒガンバナ科、アスバラガセア工科、ラン科、ヤシ科、アナナス科、アカネ科、ツバキ科、バショウ科、アオイ科またはホモノ科、およびマメ目、および特にパピリオナセア工科の植物が特に興味深い。ナス科、ジュウジバナ科およびホモノ科の代表種が好ましい。

20 【0218】本発明の範囲内の標的作物は、例えばフラガリア(Fragaria)、ロータス(Lotus)、メディケーゴ(Medicago)、オノブリーキス(Onobrychis)、トリホリウム(Trifolium)、トリゴネラ(Trigonella)、ビグナ(Vigna)、シトラス(Citrus)、リナム(Linum)、ゼラニウム(Geranium)、マニホット(Manihot)、ドーカス(Daucus)、アラビトプシス(Arabidopsis)、ブラシカ(Brassica)、ラファヌス(Raphanus)、シナピス(Sinapis)、アトロパ(Atropa)、カプシカム(Capsicum)、ダチュラ(Datura)、ハイオシヤムス(Hyoscyamus)、リコベルシオン(Lycopersion)、ニコチアナ(Nicotiana)、ソラスム(Solanum)、ペチュニア(Petunia)、ジギタリス(Digitaris)、マジョラナ(Majorana)、シコリウム(Cichorium)、ヘリアンタス(Helianthus)、ラクチュカ(Lactuca)、ブロムス(Bromus)、ゴッシピウム(Gossypium)、アスバラガス(Asparagus)、アンチリヌム(Antirrhinum)、ヘメロカリス(Hemerocallis)、ネメシア(Nemesia)、ペラルゴニウム(Pelargonium)、パニカム(Panicum)、ペンニセタム(Pennisetum)、ラヌンクルス(Ranunculus)、セネシオ(Senecio)、サルピグロシス(Salpiglossis)、ククミス(Cucumis)、プロワリナ(Browallia)、グリシン(Glycine)、ロリウム(Lolium)、ゼア(Zea)、トリチカム(Triticum)、ソルガム(Sorghum)、イポモエア(Ipomoea)、パッシフローラ(Passiflora)、シクラメン(Cyclamen)、マルス(Malus)、プルナス(Prunus)、ローザ(Rosa)、ルプス(Rubus)、ポプラス(Populus)、サンタラム(Santalum)、アリウム(Allium)、リリウム(Lilium)、ナルシサス(Narcissus)、アナナス(Ananas)、アラキス(Arachis)、ファセオルス(Phaseolus)

およびピサム(Pisum) からなる群から選択されるものを含む。

【0219】植物の試験管内培養の分野、特に植物再生の分野における新しい発展によって、ホモノ科の代表種でさえも、植物プロトプラストから出発して全体の植物を再生することが今可能となった。ホモノ科での再生実験の成功の例は、イネのプロトプラストに対して文献〔79〕に、トウモロコシのプロトプラストに対して文献〔51〕および〔60〕に、ダクチリス・グロメラタのプロトプラストに対して文献〔26〕に特に記載されている。

【0220】それ故に本発明の範囲内で、以下の植物：ロリウム、ゼア、トリチカム、ソルガム、サッカラム(Saccharum)、プロムス、オリザエ(Oryzae)、アベナ(Avena)、ホルデウム(Hordeum)、セカレ(Secale)およびセタリア(Setaria)を使用することも可能である。

【0221】従って、本発明は好ましくは、プロトプラスト、細胞、カルス、組織、器官、種子、胚、花粉、胚珠、接合子および全体の植物、その他からなる群から選択される植物材料から再生され得、そして本発明に係る組換えDNA分子の一つを含む、それらの有性および無性の後代を包含するホモノ科の群からのトランスジェニック植物に関する。

【0222】形質転換された植物細胞から得られた成熟植物はそれ自体交雑され種子を生じる。種子のいくつかは遺伝学の確立された法則に正確に従う比率でもって有用で望ましい特性をコードする遺伝子を含有する。これらの種子はトランスジェニック植物の作出のために使用され得る。

【0223】ホモ接合系は繰り返し自家受粉により、および近交系の作出により得ることができる。これらの近交系は順に雑種の発生のために使用され得る。この操作において、上記外来遺伝子を含む近交系は繁殖のためにもう一つの近交系と交雑される。

【0224】

【実施例】本発明に関する一般的な説明をした後に、本発明のよりよい理解のために次に実施例を記載するが、これは説明のためだけのものであり、特記しない限り本発明を制限するものではない。

【0225】以下に記載される本発明の特定の実施態様において、本発明に係る標的性配列を持つ、およびそれを持たない塩基性キチナーゼ、および細胞外空間に本来分泌されそしてI型またはII型キチナーゼと相同性がない非関連III型キチナーゼ(キュウリキチナーゼ)がニコチアナ・シルベストリス(Nicotiana glauca)内に発現され、そしてそれらの植物細胞内での位置が決定される。

【0226】液胞への標的指向局在のため、および細胞外空間に特異的に後記タンパク質を原則的に送り出す可能性のための、液胞内に本来存在するタンパク質のC末

端範囲の必要性は、タバコからの塩基性キチナーゼおよび塩基性グルカナーゼにより証明され得る。その末端に向けて、液胞内に本来存在するタンパク質のC末端範囲を形成する7または22個のC末端アミノ酸は、除去されるか、またはオリゴヌクレオチド仲介突然変異によりコード性配列内の適当な部位に適当な停止コドン置くことにより不活性化される。これにより引き続いて細胞空間内に送り出される突然変異グルカナーゼまたはキチナーゼを生じる。

10 【0227】他方、本発明に係る標的性配列が結合タンパク質を液胞内に特異的に方向づけ得ることを示すために、タバコからの塩基性キチナーゼのC末端配列はキュウリの葉からの酸性キチナーゼに連結される。操作は以下のとおりである：まず最初に、塩基性キチナーゼからの5'非コード性配列およびその領域に同様に位置するシグナルペプチドをコードする配列を成熟キュウリキチナーゼをコードする配列に連結する。構築物の3'末端は次にリンカー断片を介してタバコキチナーゼ遺伝子のC末端範囲からの9個のアミノ酸をコードする配列に添加される。上記構築物は次いで強力なCaMV35Sプロモーターの制御下におかれ、そしてアグロバクテリウム・チュメファシエンス形質転換によりニコチアナ・シルベストリス植物内に挿入される。

【0228】形質転換が行われたら、強いキチナーゼ発現を示すトランスジェニック植物が選択され、そしてキチナーゼの位置を分析するために使用される。プロトプラストが作成され、そしてホモジネート中およびプロトプラスト中のキチナーゼの比活性が比較される。

30 【0229】細胞内キチナーゼの細胞下局在を決定するために、液胞がプロトプラストから分離される。

【0230】一般的な組換えDNA技術

本発明において用いられる組換えDNA技術の多くは当業者にとって一般的なものであるので、それらが発見する度に記載するよりもむしろ通常用いられる技術に関してここで簡潔に記載しておく方がよい。別に特記したことを除いて、これらの全ての操作は文献〔34〕に記載されている。

40 【0231】A. 制限エンドヌクレアーゼでの切断
反応パッチは典型的には、マサチューセッツ州ピバリーのニュー・イングランド・バイオラプス(New England Biolabs)により推奨される緩衝溶液中に約50ないし500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のDNAを含む。制限エンドヌクレアーゼ2ないし5単位をDNA1 μg につき添加し、そして反応パッチを上記の会社により推奨される温度で1ないし3時間保温する。65 $^{\circ}\text{C}$ で10分間加熱するか、またはフェノールでの抽出により反応を終結させ、エタノールでDNAを沈澱させる。この方法は文献〔34〕の第104ないし106頁にも記載されている。

50 【0232】B. プラント末端を製造するためのDNAのポリメラーゼでの処理

DNA断片50ないし500 μ g/mlを、製造会社ニュー・イングランド・バイオラプスにより推奨される緩衝液中の反応バッチに添加する。反応バッチは全4種のデオキシヌクレオチド三リン酸を0.2mMの濃度で含有する。反応は15℃で30分間の期間に起こり、次いで65℃で10分間加熱することにより終結される。5'突出末端を製造する制限エンドヌクレアーゼ例えばEcoRIおよびBamHIで切断することにより得られる断片のためには、DNAポリメラーゼの大断片またはクレンジ断片が使用される。3'突出末端を製造するエンドヌクレアーゼ例えばPstIIおよびSacIにより製造される断片のためには、T4DNAポリメラーゼが使用される。これらの2つの酵素の使用は文献〔34〕の第113ないし121頁に記載されている。

【0233】C. アガロースゲル電気泳動およびゲルからのDNA断片の精製

アガロースゲル電気泳動を文献〔34〕の第150ないし163頁に記載のように水平型装置で行う。使用される緩衝液はそこに記載されているトリス-ホウ酸塩緩衝液である。DNA断片は、電気泳動の間にゲルまたはタンク緩衝液に存在するか、または電気泳動の後に添加されるいずれかの0.5mg/ml臭化エチジウムを用いて染色される。DNAを長波長の紫外線の照射により視覚化する。断片をゲルから分離する場合には、使用されるアガロースは低いゲル化温度のものであり、これはミズーリ州セントルイスのシグマ・ケミカル(Sigma Chemical)から入手できる。電気泳動後、望ましい断片を削り取り、プラスチック管内に入れ、65℃で約15分間加熱し、次いでフェノールで3回抽出し、そしてエタノールで2回沈澱させる。この操作は文献〔34〕の第170頁の記載とはわずかに異なっている。変法として、DNAはジェネクリーン・キット(Geneclean kit)[米国カリフォルニア州ラ・ジョラのバイオ101社(Bio 101 Inc.)]を用いてアガロースから単離され得る。

【0234】D. DNA末端への合成リンカー断片の付加

DNA分子末端へ新規なエンドヌクレアーゼ切断部位を添加することが望ましい場合、上の項に記載されているように、プラント末端を製造するために、場合によってはこの分子をまずDNAポリメラーゼで処理する。この断片約0.1ないし1.0 μ gを、ニュー・イングランド・バイオラプスから得られるホスホリル化リンカーDNA約10ngに、同社のT4DNAリガーゼ2 μ lおよび同社により推奨される緩衝液中の1mMATPを含有する20ないし30 μ l容量中で添加する。15℃で一晩保温後、65℃で10分間加熱することにより反応を終結させる。反応バッチを次に、合成リンカー配列で切断する制限エンドヌクレアーゼに適当な緩衝液中に約100 μ lに希釈し、そしてこのエンドヌクレアーゼ約50ないし200単位を添加する。混合物を適温で2ない

し6時間保温し、次に断片をアガロースゲル電気泳動に供し、そして上記Cのように断片を精製する。精製した断片は今では制限エンドヌクレアーゼでの切断により製造された終端を有するであろう。これらの終端は通常粘着性であり、その結果、精製断片は同じような粘着端を有するその他の断片に容易に連結され得る。

【0235】E. DNA断片からの5'末端ホスフェートの除去

プラスミドクローニング工程の間に、ベクタープラスミドのホスファターゼでの処理はベクターの再環状化を減少させる文献〔34〕の第13頁に記載されている)。正しい制限エンドヌクレアーゼでのDNAの切断の後、ペーリンガー-マンハイム(Boehringer-Mannheim)から得られる子ウシ消化管のアルカリホスファターゼ1単位を添加する。DNAを37℃で1時間保温し、次にフェノールで2回抽出し、そしてエタノールで沈澱させる。

【0236】F. DNA断片の連結

相補的な粘着端を有する断片を互いに結合させる場合、各々の断片約100ngは、ニュー・イングランド・バイオラプスからのT4DNAリガーゼ約0.2単位をこの会社により推奨される緩衝液中に含有する20ないし40 μ lの反応混合物中で保温される。保温は15℃で1ないし2時間行われる。プラント末端を有するDNA断片が結合される場合、それらはT4DNAリガーゼの量を2ないし4単位に増加させる以外は上記と同様に保温される。

【0237】G. DNAの大腸菌内への形質転換

大腸菌HB101株がほとんどの実験において使用される。文献〔34〕の第250および251頁に記載されているように、塩化カルシウム法を用いてDNAが大腸菌内に導入される。

【0238】H. プラスミドのための大腸菌のスクリーニング

形質転換の後、大腸菌の生成したコロニーは迅速プラスミド単離法により所望のプラスミドの存在が試験される。2種の慣用の方法は、文献〔34〕の第366ないし369頁に記載されている。

【0239】I. プラスミドDNAの大規模な分離

大腸菌からプラスミドを大規模に分離する方法は文献〔34〕の第88ないし94頁に記載されている。

【0240】J. M13ファージベクターにおけるクローニング

以下の記載においてファージM13誘導体の二重鎖複製体は決まりきった操作、例えば制限エンドヌクレアーゼでの切断、連結その他のために用いられることが理解されるべきである。特記しない限り、酵素はペーリンガー・バイオラプス[Boehringer, Biolabs(BRL)]から入手できる。それらはことわらない限り製造会社の指示に従って使用される。

【0241】K. サザンプロット分析

抽出したDNAを最初に制限酵素で処理し、次いで0.8%ないし1%のアガロースゲル中で電気泳動し、ニトロセルロース膜に移し〔66〕、そして予めニクートランスレーションに供された検出されるべきDNA(DNA比活性 5×10^8 ないし 10×10^8 c. p. m./ μ g)とハイブリッド形成させる。フィルターを各回1時間3回65℃で0.03Mクエン酸ナトリウムと0.3M塩化ナトリウムの水溶液を用いて洗浄する。ハイブリッド形成したDNAはX線フィルムを24ないし48時間黒化することにより可視化される。

【0242】L. ウェスタンブロット分析

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、タンパク質をニトロセルロースまたはナイロンフィルターに電気泳動で移す。このフィルターを次にブロック剤(例えばPBS中の5%スキムミルク粉末;以下ミルク/PBSと記載する)で前処理する。フィルターを次に検出されるべき化合物と反応する抗血清(今回の場合、ウサギ抗タバコキチナーゼIgG)と数時間保温する。このようにして前処理したフィルターをミルク/PBSで数回洗浄し、次いで酵素と結合している市販の第2の抗体〔例えばパーオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ抗体〔バイオラッド(BIORAD)〕、ミルク/PBS中に希釈1:2000〕と保温する。フィルターを再びPBS中で洗浄し、次に製造会社(バイオラッド)の指示に従ってクロロナフトールおよび過酸化水素で染色する。さらに詳しい記載は文献〔54〕になされている。

【0243】M. ペプチドの生成、精製および自動的配列決定のための一般的技術

還元およびアルキル化: 精製され、凍結乾燥されたタンパク質を1Mトリス-HCl(pH8.6)および10mM EDTA含有の6M塩酸グアニジンに溶解させる。ジチオトレイトール(DDT)を最終濃度20mMまで添加し、そして4-ピニルピリジンを最終濃度50mMまで添加する。このバッチを次いで窒素雰囲気中で1.5時間保温する。ピリジルエチル化された材料を次にHPLC〔アクアポアフェニルカラム(2.1×10cm, ブラウンリー)〕により脱塩する。カラムは0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中のアセトニトリル:イソプロパノール混合物(1:1)の5%から80%に及びリニアグラジエントで溶出される。

臭化シアン分解およびピログルタミン酸アミノペプチダーゼでの消化: 臭化シアン分解は文献〔65〕に従ってその場で(in situ)行われる。ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ(ペーリンガー・マンハイム)での消化は文献〔1〕に従って行われる。

Ly s C消化: タンパク質をエンドプロテイナーゼLy s C(ペーリンガー・マンハイム)で0.1Mトリス-HCl(pH8.5)中室温で24時間にわたり消化する(酵素:基質=1:10の比率)。生成するペプチドをHPLC〔アクアポアC8カラム(1×22cm, ブ

ラウンリー)〕により単離する。0.1%TFA中のアセトニトリル:イソプロパノール(1:1)のリニアグラジエント(0%ないし60%)を溶出液として使用する。

トリプシン消化: タンパク質のトリプシン(クーパー)での消化は0.1M塩化カルシウムを含む0.1M炭酸水素アンモニウム(pH8.2)中37℃の温度で行われる(酵素:基質=1:100の比率)。保温時間は5時間である。生成するペプチドをHPLC(上記参照)により分離する。この方法を変更して、消化は0.1Mトリス-HCl(pH8.5)中37℃で酵素:基質=1:50の比率を用いて行われてもよい。その場合、保温時間は24時間である。生成するペプチドをHPLC〔ヴィダックC18カラム(2.1×150cm)〕により、0.1%TFA中のアセトニトリル:イソプロパノール(1:1)のリニアグラジエント(0%ないし60%)を用いて分離する。

10

20

配列決定: 自動化エドマン分解がアプライド・バイオシステムズ470Aガス相シーケンサーを用いて行われる。フェニルチオヒダントイン(PTH)アミノ酸の同定はアプライド・バイオシステムズ129A PTHアナライザーを用いて行われる。

【0244】かなり一般的な記載を説明するために、そして本発明のよりよい理解のために、特定の実施例を記載するが、特記しない限り本発明はこれらに限定されない。同様のことが上記の例示にも当てはまる。

【0245】I. タバコからのcDNAおよびゲノム遺伝子ライブラリーの作成

実施例1: 植物材料

30

ニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425植物を温室中で、または表面滅菌種子から出発して生長させる。種子の表面滅菌は以下に行われる: 種子20ないし30個を約200 μ mの孔径を有するふるいに通し、そして市販の10%漂白液(NaOCl)10ml中で保温する。次いで種子を滅菌蒸留水で繰り返しすすぐ。

【0246】以下の実施例において、文献〔12〕に従ってニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425植物から分離され得る柔細胞組織(N)のクローン化系列を用いることが好ましい。

40

【0247】実施例2: 組織培養

リンスマイゼルおよびスクッグ〔33〕(LS)による塩およびチアミン-HCl濃度を含有し、10g/lの寒天の添加により固化された基本培地上でタバコ組織を培養する。その他の添加剤としてこの基本培地はpH指示剤例えばクロロフェノールレッド5mg/lを含有する。このLS基本培地を基にし、そして引き続き実施例において使用されるその他の培地はその他の添加剤として、例えばカイネチン(1.4 μ M)〔サイトカイニン培地〕または α -ナフチル酢酸(10.7 μ M)〔オーキシン培地〕またはカイネチンおよび α -ナフチル酢酸

の混合物〔オーキシン/サイトカイニン培地(培地A)〕を含有する。

【0248】選択培地BおよびCは α -ナフチル酢酸を含有しないが、その代わりにその物質により形質転換体が大量の非形質転換細胞および組織から選択され得るような選択物質を含有する。これらの選択培地の正確な組成はVII項(培地)に示してある。

【0249】ニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425植物から分離された貯蔵系列(275N)はオーキシン/サイトカイニン培地(10ml)上で21日間隔

セルラーゼR. 10オノズカ(ヤクルト本社製)	10.0 g/l
マセラーゼ〔カリフォルニア州ラ・ホイアのペーリング・ダイアグノスティクス(Behring Diagnostics)製のリゾプス種からのペクチナーゼ〕	2.5 g/l
ペクトリアーゼY-23(盛進製薬社製)	1.0 g/l
CaNO ₃ · 4H ₂ O	1.45 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/l
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.23 g/l
KNO ₃	1.2 g/l
D-マンニトール(pH5.70)	73.0 g/l

を含有する。

【0252】上記酵素溶液を遠心分離し、そして0.2mmフィルターを通して滅菌する。タバコ懸濁培養液と酵素溶液からなるバッチをロータリーシェーカー上(40rpm)室温で5時間注意深くかきまぜる。特定の時間間隔で、試料をこのバッチから採取し、そして顕微鏡で分析する。細胞の約80%が球形のプロトプラストに変化するまで酵素消化を続ける。次に保温容器をシェーカーから取り出す。細胞/プロトプラスト懸濁液を静置し、そして細胞およびプロトプラストを含まない培地の上半分をピペットで吸い上げて除き、それを廃棄する。残部を50ml遠心管に移し、臨床用遠心分離機(HN-SII型, IEC)内500rpmで10分間遠心分離する。プロトプラスト含有ペレットはすすぎ溶液I(VI項参照)中に再懸濁され、そして次に1000rpmで10分間再び遠心分離する。

【0253】プロトプラストを含有するバンドは遠心管の上端部に位置する。プロトプラスト画分を集め、次にすすぎ溶液Iで再びすすぐ。プロトプラストを遠心管に戻し、そして次の使用のために必要となるまで水中に保

【0254】実施例4: cDNA遺伝子ライブラリーの構築

cDNA遺伝子ライブラリーは、ニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425植物の柔細胞組織のクローン化系列(実施例1参照)から得ることができるポリ(A)+RNAから出発して作成される。タバコ組織は、無ホルモンLS基本培地上で組織を培養することにより実施例2に記載したように高レベルのキチナーゼを産生するように最初に刺激される。

* (10ml)上に接種され、そして明所25℃で培養される。

【0250】培養組織中に高レベルのキチナーゼの誘導のために、組織はオーキシン/サイトカイニン培地から無ホルモン基本培地上に接種される。植物組織の培養およびキチナーゼ誘導に関するその他の詳細は文献〔14〕に記載されている。

【0251】実施例3: タバコプロトプラストの作成
実施例1による2日令のタバコ細胞懸濁液100mlを等量の2倍濃厚酵素溶液と混合する。該酵素溶液は以下の成分:

セルラーゼR. 10オノズカ(ヤクルト本社製)	10.0 g/l
マセラーゼ〔カリフォルニア州ラ・ホイアのペーリング・ダイアグノスティクス(Behring Diagnostics)製のリゾプス種からのペクチナーゼ〕	2.5 g/l
ペクトリアーゼY-23(盛進製薬社製)	1.0 g/l
CaNO ₃ · 4H ₂ O	1.45 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/l
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.23 g/l
KNO ₃	1.2 g/l
D-マンニトール(pH5.70)	73.0 g/l

【0255】4.1: 全RNAの単離

全RNAの調製は文献〔30〕に記載された方法に実質的に従って行われる。

【0256】液体窒素で急速冷凍されたタバコ組織を乳鉢中で最初に粗く粉末化し、次に適当なホモジナイザー緩衝液の中に入れる(組織1gあたり緩衝液2.5ml)。該緩衝液は(1)7.56MグアニジンHCl、0.73Mメルカプトエタノール、18.9mM酢酸ナトリウムpH5.0、(2)4%(w/v)SDS、0.1MトリスHClpH7.8(1容量)+80%(v/v)フェノール、0.1%(w/v)ヒドロキシキノリン、0.1MトリスHClpH7.8(1容量)または(3)文献〔30〕に準拠したものいずれかである。等量のフェノールを添加した後、バッチを例えばポリトロンホモジナイゼーションでホモジナイズする。半容量のクロロホルムを次に添加し、そしてエマルジョンを約15分間注意深く混合する。次に遠心分離(10400gで10分間)により様々な相に分け、水相を廃棄する。この時点で所望するならば、さらに抽出段階を加えることも可能であるが、これは例えば付加的なフェノール/クロロホルム抽出またはフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)の混合物での抽出2回の形態で行われる。抽出の次は沈澱工程が行われる。これは0.3M酢酸ナトリウムおよびエタノール2.5容量部の添加により行われる。沈澱物を遠心分離(10400gで15分間)により集め、そして滅菌水2ml中に再懸濁させる。塩化リチウムを最終濃度3Mに添加した後、全体のバッチを4℃で一晩保温する。沈澱物を次に遠心分離により再び集め、そして形成されたペレットを氷冷エタノールで洗浄する。ペレットを

次に乾燥させ、そして滅菌水500 μ l中に再懸濁させる。この沈澱物中の全RNAの濃度は分光分析により決定される。

【0257】上記方法の変法として、全RNAはカルス組織から単離され得る。この場合もまた、上記の工程段階が使用されるが、使用される出発材料は立方体(約3mm)に切断されたカルス組織であり、これはホモジナイゼーション段階の前にまず液体窒素での急速冷凍を行い、次に予め冷却された乳鉢中で微粉末に粉碎される。

【0258】4.2:ポリアデニル化RNAの単離
ポリ(A)+RNAはそれ自体公知の方法(例えば文献[40]参照)に従って、オリゴ-d(T)セルロースクロマトグラフィー[米国マサチューセッツ州レキシントンのコラボラティブ・リサーチ(Collaborative Research)]により単離される。

【0259】オリゴ-d(T)セルロースを最初に2.0MのNaCl20容量中で15分間洗浄し、次に滅菌水中に懸濁し、そしてカラム(直径1.5cm,長さ20cm)中に充填する。カラムを次に緩衝液(440mM NaCl, 0.9mM EDTA, 9mM トリス-HCl, pH7.5;または0.5MのNaCl, 10mM トリス-HCl, pH7.5)で、溶出液のpHが7.0ないし7.6になるまで洗浄する。4.0mlの容量中のRNA含量が0.6mgないし6.0mgのRNA溶液を、最終濃度EDTAが1mM、そしてピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)が10mM、pH7.5に調整する。RNAを70℃で5分間加熱することにより変性させ、そして氷上で冷却する。全体の溶液を次に4MのNaCl0.1容量部で0.36MのNaClの値に調整する。RNA溶液をカラムに入れ、そして非ポリアデニル化RNA[ポリ(A)+RNA]を上記緩衝液で溶出させる。溶出液の吸光度は分光光度計(日立100-40型)およびそれに連結されたW+Wレコーダー[スイス国バーゼルのサイエンティフィック・インストルメンツ(Scientific Instruments)]により決定される。吸光度が基底状態に達したらすぐに、カラムに結合されているポリ(A)+RNAを1mMEDTA, 10mMトリス-HCl pH7.5で溶出させる。溶出液を0.5mMEDTAおよび0.3M酢酸ナトリウムpH5.0の溶液中に導入し、そしてエタノール2.5容量部の添加により沈澱させる。次に83000 \times g(30ないし45分)の遠心分離によりRNAを集め、窒素下で乾燥させ、そして1mMEDTA, 10mMトリス-HCl pH7.5または水中に再懸濁させる。

【0260】4.3:cDNAクロンの構築および選択

5-25%(w/v)ショ糖グラジエント(1mMEDTA; 10mMトリス-HCl, pH7.5)上での調製超遠心分離(57000gで17時間)によりポリ

(A)+RNAを個々の画分に分離する。キチナーゼに対する情報を含有する画分は抗キチナーゼ抗体による試験管内での翻訳の後に同定され得る。これらの画分を次に一緒にし、そしてさらに仕上げのために使用する。

【0261】抗キチナーゼ抗体作成の操作は当業者には公知であり、そして例えば文献[63]および[39]に記載された方法に従って実施され得る。その方法において、完全フロイントのアジュバント中の精製キチナーゼ調製物を含む実質的なエマルジョンは3ヵ月令のメスウサギ(ニュージーランド白色ウサギ)に注射される。さらに1週間後および2週間後そしてその後1ヵ月間隔で注射を行う。血液は各注射の7ないし10日後に採取され、血清試料を-20℃で保存する。免疫グロブリンGはプロテインA-セファロースC14Bカラム[ファルマシア(Pharmacia)]上のアフィニティクロマトグラフィーにより精製され、次いで凍結乾燥され、そして-20℃で保存される。

【0262】ポリ(A)+RNAマトリックスから出発する二重鎖DNAの合成、pBR322内での該二重鎖DNAのクローニング、分別コロニーハイブリダイゼーションおよびプラスミドの分離は、文献[34]の指示および記載に実質的に従って行われる。

【0263】二重鎖DNA約0.8 μ gの合成のために、予め単離され、そしてキチナーゼmRNAで富化されたポリ(A)+RNA3 μ gを逆転写酵素[フロリダ州サンベテルスブルクのライフ・サイエンセズ(Life Sciences)]およびDNAポリメラーゼI(マサチューセッツ州ピバリーのニュー・イングランド・バイオラプス)と保温する。生成するcDNAをホモポリマー-dC-dGテーリングによりpBR322のPstI切断部位内にスプライシングさせる。該テーリングはcDNAとベクターDNAに相補的な粘着端を付与することを可能にし、そして文献[34]の217-219頁に記載されている。オリゴ-dC末端を有するPstI直線化ベクターpBR322は市販されている。

【0264】生成する組換えプラスミドは次にコンピテント大腸菌DH1細胞の形質転換のために使用される。プラスミド内でのクローニングは文献[34]の242-246頁および391頁に記載されている。

【0265】寒天プレート上の細菌コロニーの形態にあるこのようにして構築されたcDNAライブラリはまず最初に放射活性標識cDNAを用いる分別コロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングされる。

【0266】分別コロニーハイブリダイゼーションにおいて、細菌コロニーの複製は寒天プレート上にフィルターを置き、次にそれらを再び注意深く取り除くことにより、ニトロセルロースフィルターで行われる。最初の寒天プレートは陽性コロニーの後の同定のために保存される。細菌コロニーを付着しているフィルターを次に栄養培地上に置き、そしてコロニーが約2mmの大きさに成

長するまで放置する。フィルターを次に、細菌細胞の溶解およびフィルター上の細菌DNAの変性および固定を導く水酸化ナトリウム溶液で処理する。pHを中和した後、フィルターを繰り返し洗浄し、乾燥し、そして最後に真空中80℃の温度で「黒化」し、その結果DNAをフィルターに共有結合させる。

【0267】フィルターを放射標識（非クローン化）cDNAプローブと連続して2回ハイブド形成させる。これらのcDNAプローブは、キチナーゼを産生するように予め誘導された（ホルモンを添加しない基本培地で7日間の保温）タバコ組織からのポリ(A)+RNAおよび非誘導化タバコ組織からのポリ(A)+RNA（オーキシン/サイトカニン上で7日間の保温）である。非誘導化組織からの対照DNAと反応するよりも、誘導化組織からのcDNAとより強く反応する有望cDNAクローンは文献〔40〕および〔39〕に記載された方法に従う「ハイブリッド選択」翻訳法を用いるその他の分析に供される。プラスミドDNAを0.2Mないし0.3MのNaOH、3MのNaCl中で1分間煮沸することにより変性させ、そして氷上で冷却させる。ハイブリダイゼーション反応はフィルターあたり200μgないし250μgの全RNAを用いて、スクエアBA/85ニトロセルロースフィルター〔西ドイツ国ダッセルのシュライヒャー・ウント・シューエル(Schleicher und Schuell)〕上で行われる。フィルター上でハイブド形成されたRNAを溶出させ、エタノールで沈澱させ、そして水10μl中に溶解させ、試験管内翻訳（市販の小麦麦芽抽出物を用いる）により分析される。放射標識された生成物は所望のタンパク質に対する抗体と沈澱し、そしてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析される。

【0268】4.4:cDNAクローンpCHN48

cDNA遺伝子ライブラリはコロニーまたはブランクハイブリダイゼーションを用いて文献〔34〕に従ってスクリーニングされる。DNAプローブとして、成熟タンパク質をコードする全体のDNA配列を含むが完全なN末端シグナルペプチド配列を欠いている文献〔62〕に記載されたcDNAクローンpCHN50が用いられている。このようにして異なる長さを有する種々のクローンを得られる。これらのクローンの最長のものが選択され、そしてヌクレオチド配列分析に供される。pCHN48と記載されるこのクローンは1.14kbからなり、そしてポリ(A)末端に7個のアデノシン、329個のアミノ酸からなるポリペプチドに相当する単一の大きな読み枠（読み取り可能枠）長さ987ヌクレオチド、および5'非翻訳領域からのヌクレオチドを有する挿入物を有する。コード領域のDNA配列から誘導可能なアミノ酸配列は、タバコからの公知キチナーゼの20個の最初のN末端アミノ酸に対する配列に一致する。

【0269】実施例5:ゲノム遺伝子ライブラリの構

築

5.1:染色体タバコDNAの単離

プロトプラストの溶菌のために、氷冷プロトプラスト懸濁液100mlを氷冷TENP緩衝液(VII項参照)400mlと混合する。IEC臨床用遠心分離機中2000rpmで10分間遠心分離することによりこの溶菌物から核を分離する。そのように得られるペレットを氷冷TENP緩衝液500ml中に再懸濁し、そして上記のように再びペレット化する。次いでCsClグラジエント試験管8本を準備し、各試験管中のプロトプラスト懸濁液約12.5mlを含む細胞ペレットを10倍濃厚TE緩衝液(VII項参照)26mlに添加する。細胞核を溶菌するために、20%(w/v)ナトリウムラウリルサルコシン溶液5mlおよびCsCl32.2gおよび臭化エチジウム溶液(EtBr;10mg/ml)2.89mlをバッチに添加する。全体のバッチをゆっくりかきまぜ、CsClを溶解させる。

【0270】このようにして得られた溶菌物をポリアロマー試験管(ベックマンVTi50,39ml試験管)に移し、そして45000rpmおよび20℃で16時間VTi50ローター〔ベックマン(Beckman)〕中で遠心分離する。紫外線で蛍光性であるバンドが16ゲージの針を付けた3mlのシリンジによりグラジエントから除去され、そして集められる。さらにDNAの仕上げが上記のCsCl/EtBr平衡遠心分離の反復により行われる。蛍光性バンドが再び集められ、付着するEtBrが20×SSC(VII項参照)で飽和されたイソプロパノール(等量)を用いる6回の連続抽出段階で除去される。DNAがグラジエント溶液から沈澱され、そして蒸留水2容量、3.0M酢酸ナトリウム(pH5.4)0.1容量およびエタノール2容量を連続的に添加することにより上記のように精製される。フィラメント状のDNAをパスツールピペットにより溶液から巻き取り、70%エタノールで洗浄し、そしてさらに等量のクロロホルムで抽出する。3M酢酸ナトリウム(pH5.4)0.1容量およびエタノール2.0容量を添加することによりDNAを沈澱させる。DNAフィラメントを再び巻き取り、70%エタノールで洗浄し、そして5分間風乾する。これを次に全量7mlのTE緩衝液(VII項参照)中に溶解し、そして次の使用まで4℃で保存する。

【0271】5.2:ゲノム入遺伝子ライブラリの構築

予め単離されたタバコDNAを制限酵素Sau3Aで消化し、SW41ローター(ベックマン)内20000rpmでの10%-40%ショ糖グラジエントにより20時間分離する。グラジエントから得られる画分をゲル電気泳動(TBE緩衝液中0.5%のアガロースゲル)により分析する。正しい大きさの断片を有する画分を貯める。3M酢酸ナトリウム(pH4.8)0.1容量およ

びエタノール2容量を用いてDNAを沈澱させ、そしてBamHI〔カリフォルニア州ラ・ホイアのストラタゲン(Stratagen)〕で消化されたホスファターゼ処理された1EMBL3DNAと連結させる。連結反応は製造会社の指示に従って行われ、1-ベクターDNA1μgおよび組み入れられるべきタバコDNA0.1μgを含有する5μlの反応バッチが使用される。この連結反応から生じるDNAの1-フェージの頭部への組入れはストラタゲンによるギガバック・プラス・キットを用い、製造会社の指示に従って行われる。大腸菌CES201(Glover DM)の感染後に得られたフェージは挿入されたDNA1μgあたり約2×10⁶フェージである。

【0272】5.3: 遺伝子ライブラリのスクリーニングおよびゲノムクローンの分離

ゲノム遺伝子ライブラリはコロニーまたはプラークハイブリダイゼーションを用いて文献〔34〕に従ってスクリーニングされる。文献〔62〕に記載されたcDNAクローンpCHN50および4.4.項で単離されたクローンpCHN48がDNAプローブとして使用される。

【0273】この方法で得られる組換え体は精製され、そしてサザンブロット分析を用いて部分的に特徴づけられる。これらのクローンの一つはcDNAプローブ分子pCHN50およびpCHN48との非常に強いハイブリダイゼーションシグナルを示し、そしてサザンブロット分析に従って完全なキチナーゼ遺伝子を含有するが、さらに試験のために選択され、そして1-CHN17と記載される。

【0274】実施例6:ゲノムタバコキチナーゼクローン1-CHN17

6.1: DNA配列決定および配列分析

制限酵素HindIIIでの消化の後、完全なキチナーゼ遺伝子を含有し、そしてタ

バコDNAからの同様の大きさの断片に関連する5.4kb DNA断片が得られる。3850bpからなり、そして全体のコード配列を含むこの断片の一部を次に配列決定する。

【0275】制限断片を適当なクローニングベクター、

アミノ末端

Lys Cペプチド

Ala Gly Ile Ala Ile Tyr Trp Gly Gln Asn Gly
Asn Glu Gly Ser Leu Ala Ser Thr Cys Ala Thr
Gly Asn Tyr Glu Phe Val Asn Ile Ala Phe Leu
(Lys) Asn Phe Gly Gln Val Ile Leu Ser Ala Ala
Pro Gln Cys Pro Ile Pro Asp Ala His Leu Asp
Ala Ala Ile Lys
(Lys) Thr Gly Leu Phe Asp Ser Val Trp Val Gln
Phe Tyr Asn Asn Pro Pro Cys Met Phe Ala Asp
Asn Ala Asp Asn Leu Leu Ser
(Lys) Leu Tyr Met Gly Leu Pro Ala Ala Arg Glu
Ala Ala Pro Ser Gly Gly Phe Ile Pro Ala Asp
(Lys) Ala Ser Ser Asn Tyr Gly Gly Val Met Leu

例えばM13mp18またはM13mp19〔74〕内にクローン化し、ジデオキシヌクレオチド法〔55〕により両方の開始部位の配列決定を行う。決定されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列はジェネティクス・コンピュータ・グループ・ソフトウェア〔10〕を用いてコンピュータによりさらに分析される。

【0276】遺伝子48と命名されるタバコからの塩基性キチナーゼ遺伝子の完全なDNA配列は配列番号:10に示されているとおりである。cDNAクローンpCHN48とpCHN50との配列比較は、遺伝子48のコード領域内に2か所の介在配列部位(イントロン)があることを明らかにしている。これらのイントロンの最初のもは274bpからなり、そしてグリシンをコードするコドン148の第一ヌクレオチドと第二ヌクレオチドとの間に位置する。第二のイントロンは長さ269bpであり、ヒスチジンをコードするコドン199の第二ヌクレオチドと第三ヌクレオチドとの間に位置する。両方のイントロンは、公知のその他の公知植物および動物イントロンと一致して、ドナーおよびアクセプター配列(GTAAAGTCおよびACAG)を有するコンセンサスプライミング部位を有する。さらに、両方のイントロンは配列CT(G/A)A(C/T)、動物コンセンサス配列(PyTPuAPy)と類似性を有する3'境界からの33ヌクレオチドを有する。これらのコンセンサス配列は切除における投げなわ中間体の形成に関与する。

【0277】遺伝子48のエキシソンのヌクレオチド配列はクローンpCHN48のコード領域のDNA配列と同一である。

30 【0278】実施例7:キュウリの葉からのcDNA遺伝子ライブラリの生成

7.1: キュウリキチナーゼの精製およびアミノ酸配列
病原体により誘導され得るキチナーゼタンパク質を文献〔38〕に記載された方法に従って感染させたキュウリの葉から単離する。次にペプチドを公知の方法によりこの同種タンパク質調製物から生成する。これらのペプチド断片のアミノ酸配列を以下にまとめる:

Trp Ser Lys
 CNBRペプチド (Met) Phe Ala Asp Asn Ala Asp Asn Leu Leu Ser
 (Met) Gly Leu Pro Ala Ala Arg Glu Ala Ala Pro
 Ser Gly Gly Phe Ile Pro Ala Asp Val Leu Ile
 Ser Gln Val Leu Pro Thr Ile
 トリプシンペプチド Val Leu Leu Ser Ile Gly Gly Gly Ala
 Thr Gly Leu Phe Asp ? Val
 Leu Tyr Met Gly Leu Pro Ala Ala
 Ala Ser Ser Asn Tyr Gly Gly Val
 Ala Phe Asp Asn Gly Tyr

【0279】7. 2: TNV感染キュウリ葉からのcDNAライブラリアの作成

キュウリの葉をタバコ壊死ウイルス (TNV) に感染させる。感染5日後、RNAを上記したように単離する (実施例4. 1参照)。

【0280】ポリアデニル化RNA [ポリ (A) + RNA] を標準法 (項4. 2参照) により単離し、そしてcDNA遺伝子ライブラリアの作成のために使用する。これは文献 [21] の方法に従って入Zapクローニングベクター [ストラタゲン (STRATAGEN)] 中で実質的に作成される。

【0281】7. 3: キュウリキチナーゼをコードするcDNAクローンの単離

上で決定されたアミノ酸配列からの2つの領域がオリゴヌクレオチドプローブの作成のために選択される。合成されたオリゴヌクレオチドプローブは選択されたペプチドをコードし得るmRNAの全ての可能な組合せをカバーする:

G T A

プローブ1: 5' -CCATTCTGNC CCCAGTA -3'

G G G G C

プローブ2: 5' -GGATTATTATAAAAATTGNACCCA -3'

約300000プラークが前もって構築されたcDNAライブラリアからプレートにより得られる。これらのプラークの2重コピーが³²P標識オリゴヌクレオチド混合物1 (プローブ1) または2 (プローブ2) で試験される。両方のプローブとで陽性の結果を与えるプラークが単離される。プラークの単離および自動切断は製造会社の推奨 (ストラタジーン・ラムダ・ザップ・ラボラトリー・マニュアル, 米国サンジエゴのストラタゲン) に従って行われる。

【0282】適切な陽性クローンは「ブルースクリプト」プラスミド中にスプライシングされ、そしてpBSCucCh5と表される。このcDNAクローンの配列はジデオキシ配列決定法により決定され得る (配列番号: 11参照)。

【0283】II. キチナーゼおよびグルカナーゼ突然変異体の構築

II. 1. キチナーゼ突然変異体

実施例8: 新規制限部位の導入

20

キチナーゼ突然変異体の構築において、使用されるキチナーゼクローンの種々の部分は互いに連結される。この目的を達成するために、それらの部分は類似していなければならない、すなわち、適当な制限切断部位は種々の配列中に導入されなければならない。以下の示した制限切断部位が使用され、それらは全て同一粘着端を導く:

BamHI [G/GATCC]

BclI [T/GATCA]

BglII [A/GATCT]

読み枠は、GATがアスパラギン酸のコードンとして機能するように各々の場合において選択されるのが好ましい。

【0284】実施例9: タバコキチナーゼ遺伝子の突然変異体の構築

ゲノム性キチナーゼクローンCHN17のサブクローン化断片 (その製造は項12. 2参照) であるpCHN87からのEcoRI /HindIII 挿入物をプラスミドpTZ18R中にスプライシングすることによりpTRCH1が得られる。プラスミドpTZ18Rはファルマシアから市販されている。

30

【0285】全体のcDNA配列を含むcDNAクローンpCHN48 (項4. 4参照) の挿入物はPstIでの部分消化により単離され、そしてプラスミドpUC8内にクローン化される。そのように形成されたクローンはpCHN6と表される。

【0286】pCHN6からのPstI大断片をプラスミドpUC8内にクローン化し、ポリリンカー内にスプライシングされた挿入物の配向と相違する2つの異なるクローン (pUCH2およびpUCH3) を形成する。

40

【0287】pUCH2からのEcoRI /HindIII 断片を次に単離し、そしてプラスミドpTZ18U内にスプライシングする。プラスミドpTUCH2がこのようにして得られる。プラスミドpTZ18Uは同様にファルマシアから市販されている。

【0288】pUCH3からのEcoRI /HindIII 断片を同様に単離し、そしてプラスミドpTZ18R内にクローン化する。このようにして形成されたクローンはプラスミドpTRCH3と表される。

50

【0289】実施例10: オリゴヌクレオチド仲介突然変異誘発

57

オリゴヌクレオチド仲介突然変異誘発のために、以下のオリゴヌクレオチドが当業者には公知である慣用の方法により合成される：

No. 1	CIGCCTCGGC <u>TGATCA</u> ATGTGG
No. 2	TTTGGAAAT <u>I</u> GACTC TTAGTCG
No. 3	CCAG AG <u>ATCT</u> TTTGGGAAATGG
No. 4	GACTTTTAGTC <u>A</u> ATACTATGTAA
No. 5	GACTTTTAGTC <u>CG</u> TACTATGTAA
No. 6	CTTTGGAAA <u>AGATCT</u> TTTAGTCG
No. 7	CCGCTCTC <u>GGATCC</u> GGCTGG
No. 8	CAGCATCGG <u>A</u> <u>TGATCA</u> GGAAGCTC
No. 9	CATCT TCT <u>AGA</u> TTTAGTCTC

野生型と比較して変化しているヌクレオチドは下線を付しボールド体で示している。制限切断部位は空白により示されている。オリゴヌクレオチドNo. 8中の欠失は△により示されている。オリゴヌクレオチドNo. 3およびNo. 8中の挿入はイタリック体で示されている。

【0290】 10. 1：タバコキチナーゼクローンの突然変異誘発

一本鎖プラスミドを作成するために、出発プラスミドを大腸菌の d a m⁻ 株内に上記バクテリアをヘルパーファージM13KO7（ファルマシア）と一晚培養すること*

H ₂ O	18.5 μl
溶液B〔0.2Mトリス-HCl (pH7.5), 0.1M MgCl ₂ , 0.1M DTT〕	2.0 μl
10mM ATP	2.0 μl
dNTP混合物 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP各10mM)	2.0 μl
クレノウ断片	1.0 μl
T4DNAリガーゼ	0.5 μl

この混合物を32℃の温度で30分間保温し、次いで室温でさらに2ないし16時間保温する。

【0294】このバッチの4分の1を感応性大腸菌mut S細胞（修復一欠損株）内に形質転換する。これらの細胞を2×Lまたは2×TY培地中37℃で3ないし6時間揺動する。プラスミドDNAを次に当業者には公知の微量調製法により単離する。単離されたDNAを次に、アンピシリン含有培地での平板培養により得られる感応性大腸菌DH5a細胞内に形質転換する。突然変異体は次に放射標識突然誘発性オリゴヌクレオチドを用いるコロニーハイブリダイゼーションにより非常に容易に同定され得る。さらに、全ての突然変異体は突然変異の結果として切断部位を得るか、または失っているので、制限分析が行われ得る。

【0295】 10. 1. 2. pTRCH4
プラスミドpTRCH1をオリゴヌクレオチドNo. 1で突然変異させる。この新規に形成されたプラスミドはpTRCH4と表される。この突然変異において、BclI制限切断部位は成熟キチナーゼをコードするDNA配列の第1コドンに導入され、コードされるアミノ酸はグル

58

*により導入する。次いでこれらのプラスミドは酢酸アンモニウムおよびポリエチレングリコール (PEG6000) により培養上澄みから非常に容易に沈殿され得、そしてフェノール/クロロホルムおよびクロロホルムで抽出される。エタノールで再び沈殿させた後、単離されたDNAは実際の突然変異誘発のために使用される（突然変異誘発あたり培養物約5mlからのDNA）。

【0291】各オリゴヌクレオチド200 pmolを0.1Mトリス-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、6mMジニトロトレイトール (DTT)、2mMATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼ5単位中、37℃の温度で45分間リン酸化する。反応は60℃で10分間保温することにより停止させる。

【0292】一本鎖DNAをリン酸化オリゴヌクレオチド2.5 μlおよび溶液A〔0.2Mトリス-HCl (pH7.5), 0.1M MgCl₂, 0.5M NaCl, 10mM DTT〕1 μlと最終容量30 μlで混合し、そして最初に80℃で5分間、次に室温で20分間保温する。

【0293】以下の混合物10 μlを次に各試験管に添加する：

タミン酸からアスパラギン酸に変化する (Glu1→Asp1)。
【0296】 10. 1. 3. pTRCH6 プラスミドpTRCH3をオリゴヌクレオチドNo. 2で突然変異させる。この新規に形成されたプラスミドはpTRCH6と表される。この突然変異において、成熟キチナーゼをコードするDNA配列のコドン300はグリシンコドンから停止コドンに変化し (Gly300→停止300)、そしてHinfI 制限切断部位は同時に導入される。
【0297】 10. 1. 3. pTUCH6 上記突然変異を含む、pTRCH3のHindIII /PvuII断片およびpTRCH6のPvuII /HindIII断片を予めHindIII /EcoRIで切断したベクターpTZ18U内にスプライシングする。プラスミドpTUCH6はこのようにして得られる。
【0298】 10. 1. 5. pTUCH7 プラスミドpTUCH2をオリゴヌクレオチドNo. 3で突然変異させる。この新規に形成されたプラスミドはpTUCH7と表される。この突然変異において、BglI

I 制限切断部位は成熟キチナーゼをコードするDNA配列のコードン295/296の領域に導入される。この制限切断部位は上記のその他の突然変異体の場合とは異なる読み枠に位置しており、Gがコードン297に挿入されている。適合読み枠はこのようにして再び得られる。

【0299】10. 1. 6. pTUCH8

プラスミドpTUCH2をオリゴヌクレオチドNo. 4で突然変異させる。この新規に形成されたプラスミドはpTUCH8と表される。この突然変異において、成熟キチナーゼをコードするDNA配列のコードン304はアスパラギン酸コードンからアスニンコードンに変化する(Asp304→Asn304)。これはTaqI切断部位の損失を導く。

【0300】10. 1. 7. pTUCH9

プラスミドpTUCH2をオリゴヌクレオチドNo. 5で突然変異させる。この新規に形成されたプラスミドはpTUCH9と表される。この突然変異において、コードン304はアスパラギン酸コードンからアルギニンコードンに変化し(Asp304→Arg304)、同様にTaqI切断部位の損失を導く。

【0301】10. 1. 8. pTUCH10

プラスミドpTUCH2をオリゴヌクレオチドNo. 6で突然変異させる。この新規に形成されたプラスミドはpTUCH10と表される。この突然変異において、コードン299はアスパラギンコードンからリジンコードンに変化し(Asn299→Lys299)、そしてコードン300はグリシンコードンからアスパラギン酸コードンに変化する(Gly300→Asp300)。BglII切断部位が同時に導入される。

【0302】10. 2. キュウリキチナーゼクローンの突然変異誘発

キュウリキチナーゼクローンの突然変異誘発は実施例1. 1に記載した方法と同様に行われる。

【0303】キュウリキチナーゼcDNAクローンpBSCucCht5(項7参照)からのEcoRI挿入物をプラスミドpTZ18U内にクローン化する。そのようにして得られたプラスミドをpTUCU2と表す。

【0304】10. 2. 1. pTUCU4

pTUCU2をオリゴヌクレオチドNo. 7で突然変異させる。この新規に形成されたプラスミドはpTUCU4と表される。この突然変異において、BamHI制限切断部位がシグナルペプチドをコードするDNA配列の最後のコードンに導入され、その結果として続くコードンが変化し、アラニンの代わりにプロリンをコードする(Ala1→Pro1)。

【0305】10. 2. 2. pTUCU5

pTUCU2をオリゴヌクレオチドNo. 8で突然変異させる。この新規に形成されたプラスミドはpTUCU5と表される。この突然変異において、BclI制限切断部位がキュウリキチナーゼの停止コードンの領域に導入され

る。結果として停止コードンがアスパラギン酸コードンに変化する(停止268→Asp268)。

【0306】10. 2. 3. pTUCU6

pTUCU2をオリゴヌクレオチドNo. 9で突然変異させる。この新規に形成されたプラスミドはpTUCU6と表される。この突然変異において、XbaI制限切断部位がcDNA配列の3'非コード性配列の領域(クローンpBSCucCht5のヌクレオチド981-986の領域)に導入され、その結果としてベクターpGY1内へのクローニングが可能になる。

【0307】II. 2. グルカナーゼ突然変異体

実施例11: PCR仲介突然変異誘発

C末端範囲の最初のアミノ酸をコードする塩基トリプレット(GTC=バリン)をPCR法により停止コードンTGAに変化させる。

【0308】PCR突然変異誘発を行う方法は当業者には非常によく知られている。それらは例えば以下の文献: [72], [29], および[11]。さらに、相当するPCRキットはパーキナーエルマー・シータス(米国コネチカット州ノーウォーク)やその他の会社から市販されており、そして操作はその中の指示書に従って行われ得る。

【0309】11. 1. pCIB1005BΔVTPの構築この構築は、米国メリーランド州ロックヴィレにあるアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)にATCC番号40770の下に寄託されており、その構築がEP-A0392225に詳細に記載されているプラスミドpCIB1005Bから出発して行われる。

【0310】プラスミドpCIB1005BはCaMV35S発現ベクターにおいて、完全なN末端シグナル配列および22個のアミノ酸からなるC末端範囲を有するタバコからの完全キメラ塩基性プレプロβ-1, 3-グルカナーゼをコードする。下に記載される生成物であるプラスミドpCIB1005BΔVTRは同様のグルカナーゼをコードするが、22個のアミノ酸からなるC末端範囲が、成熟タンパク質をコードする配列の末端への停止コードンの挿入により機能的に欠失されている。

【0311】以下のオリゴヌクレオチドがPCR増幅に使用される: オリゴ1: 5'-GGG ACA CAC GTG CAC CTT -3' オリゴ2: 5'-CTG TCC CAA ACT CCA CC A GAT CAC CCA AAG TTG ATA TTA TAT T -3' オリゴ3: 5'-AAT ATA ATA TCA ACT TTG GGT GAT CTG GT G GAG TTT GGG ACA G -3' オリゴ4: 5'-GCC TC C CCT TCA TCGTCC -3' オリゴヌクレオチド1(オリゴ1)はXhoI切断部位の上流に位置するグルカナーゼDNAのコード性領域内の配列に相当する。オリゴヌクレオチド3(オリゴ3)は挿入される停止コードンおよびC末端範囲をコードする配列の一部が続く成熟グルカナーゼタンパク質をコードする配列の3'末端の領域にある

61

領域を含む。オリゴヌクレオチド2（オリゴ2）はアンチセンス配向にある他はオリゴ3に相当する配列を有する。オリゴヌクレオチド4（オリゴ4）はSacI切断部位の下流のpCIB1005Bのtm13'領域に位置する配列を含む。

【0312】3つのPCR反応が行われる：

(1) プライマーとしてオリゴ1およびオリゴ2ならびに鋳型としてpCIB1005Bを用いるPCR1；

(2) プライマーとしてオリゴ2およびオリゴ4ならびに鋳型としてpCIB1005Bを用いるPCR2；

(3) プライマーとしてオリゴ1およびオリゴ4ならびに鋳型としてPCR1およびPCR2反応の生成物を用いるPCR3。PCR3の最初の2つの工程は鋳型とだけ行われ、そして次にプライマーだけが添加される。

【0313】PCR3反応の生成物をSacIおよびXhoIで消化し、そしてアガロースゲルにより分離される。725bpに相当するバンドをゲルから切出し、そして精製する。

【0314】プラスミドpCIB1005Bを次に同様にXhoIおよびSacIで消化し、そしてリガーゼ反応における消化および精製PCR3断片に一晩連結させる。連結混合物は感受性大腸菌DH5a細胞を形質転換するために使用される。プラスミドpCIB1005BおよびpCIB1005BΔVTPを形質転換された細胞の一晩培養物から単離し、そしてニコチアナ・ブルムバギニホリア(Nicotiana plumbaginifolia)プロトプラストの引き続き感染のために使用される。この方法で得られる構築物の正確さは配列分析により確認される。

【0315】III. 植物発現プラスミド内へのキチナーゼ突然変異体の混入

実施例12：プラスミドpSCH10の構築

プラスミドpSCH10は、ベクタープラスミドpGY1中にスプライシングされた、ゲノムクローンCHN17ならびにcDNAクローンCHN48からなる、タバコキチナーゼをコードする配列を含む。この配列の両側にはCaMVウイルスの35Sプロモーターおよび終結配列が位置している。この構築物はそれ故に野生型キチナーゼ構築物である。それを以下に詳細に記載する。

【0316】12.1：プラスミドpGY1の構築

プラスミドpGY1は文献〔49〕に記載された植物発現ベクターpDH51から誘導される。プラスミドpGY1では出発プラスミドpDH51のNcoI切断部位がXhoI切断部位に置換されていた。

【0317】プラスミドpDH51がNcoIで切断され、そして突出末端がクレノウポリメラーゼを用いて充填される。このときプラントである末端はXhoIリンカー(CTCGAGG)と連結される。

12.2：プラスミドpSCH10の構築

プラスミドpSCH10はキチナーゼをコードする配列、5'の転写される非コード性配列(転写開始部位の

62

上流に位置するキチナーゼ遺伝子48の21塩基対)および31bpの転写される非コード性配列を、CaMV35S植物発現ベクターpGY1のBamHI/PstIクローニング部位内にスプライシングされて含む。

【0318】pSCH10の作成に必要な工程段階は以下にさらに詳細に記載される：

(1) キチナーゼ遺伝子48を含むゲノムクローン1-CHN17をHindIIIで切断する。生成する5.6kbのHindIII断片を単離し、そしてプラスミドpUC8のHindIIIクローニング部位内にスプライシングし、プラスミドpCHN65を形成する。

(2) プラスミドpCHN65をEcoRIで切断し、キチナーゼコード化領域の5'末端を含む生成する2.5kb断片を同様にpUC8にクローン化する。生成するプラスミドをpCHN68と記載する。

(3) プラスミドpCHN68をPstIで消化し、そして0.5kbPstI/EcoRI断片を失って再び連結する(それ自体に連結する)。生成するプラスミドをpCHN74と記載する。

(4) 遺伝子48の転写の5'非コード領域をBamHI切断部位の後方にクローン化するために、プラスミドpCHN74を最初にHphIで消化し、次にT4DNAポリメラーゼの作用によりプラント末端を付与し、そして最後にPstIで切断する。HphI/PstI断片を単離し、そしてHincII/PstI〔70〕で消化されたプラスミドpUC8内にスプライシングし、pCHN87を形成する。配列決定の後、最後の工程段階の間に1/2 HincII切断部位の塩基が失われたことをDNA配列に対する参照により見ることができ。

(5) pCHN87をEcoRIおよびHindIIIで消化し、そしてクローニングベクターpUC9〔70〕内にスプライシングする。生成するプラスミドはpCHN88と記載される。

(6) タバコcDNAクローン48(pCHN48)の1kbPstI断片をプラスミドpUC8のPstIクローニング部位内にスプライシングし、pCHN78を形成する。

(7) プラスミドpCHN78のPstI挿入物を制限酵素PstIでプラスミドを切断することにより外し、そしてpCHN88のPstI部位にスプライシングし、結果としてキチナーゼをコードする完全なDNA配列を再構築する。生成するプラスミドはpCHN89と記載される。

(8) プラスミドpCHN89を次にBamHIで完全に消化し、そしてPstIで部分的に消化する。生成する1.5kb断片を、同様にBamHIおよびPstIで予め切断された植物発現ベクターpGY1内にクローン化し、pSCH10を形成する。このクローニング段階の結果として、キチナーゼをコードするDNA配列はCaMVプロモーターとCaMV終結配列との間に位置している。

【0319】実施例13：植物発現プラスミドpSCH

10内へのキチナーゼ突然変異体の混入

13. 1: タバコキチナーゼ突然変異体の混入

プラスミド pSCH10 の PstI断片を以下のPstI断片に置換する:

pTUCH6のPstI断片 → pSCM3

pTUCH7のPstI断片 → pSCM25

*
 pSCH10: 5'- GGA AAT GGA CIT TTA GTC GAT ACT AGT TAA -3'
 pSCM24: 5'- GGA AAA GAT CIT TTA GTC GAT ACT ATG TAA -3'
 pSCM22: 5'- GGA AAT GGA CIT TTA GTC AAT ACT ATG TAA -3'
 pSCM23: 5'- GGA AAT GGA CIT TTA GTC CGT ACT ATG TAA -3'

野生型プラスミド (pSCH10) と比較して変化している (突然変異している) ヌクレオチドはボールド体で示され、下線を付してある。

【0320】13. 2: キュウリキチナーゼ突然変異体の混入

13. 2. 1. プラスミド pSCU1

プラスミド pSCM1からのEcoRI /BclI断片および pTUCU4からのBamHI /EcoRI断片を、前もってEcoRIで切断したプラスミド pTZ18U内にクローン化する。プラスミド pTUCU7が形成される。

【0321】プラスミド pTUCU7からのEcoRI /NsiI断片およびプラスミド pTUCU6からのNsiI/EcoRI断片を、前もってEcoRIで切断したプラスミド pTZ18U内にクローン化する。プラスミド pTUCU11が形成される。

【0322】プラスミド pTUCU11を次にBamHI およびXbaIで消化し、そしてBamHI /XbaI断片を単離する。次いで前もってBamHI /XbaIで切断したプラスミド pGY1内にスプライシングし、プラスミド pSCU1を形成する。

* pTUCH8のPstI断片 → pSCM22

pTUCH9のPstI断片 → pSCM23

pTUCH10のPstI断片 → pSCM24

これらのプラスミドは今3'末端標的性配列を含み、以下のヌクレオチド配列を有する:

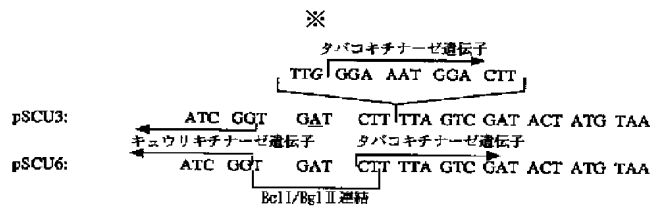
10※【0323】13. 2. 2. プラスミド pSCU3

プラスミド pTUCU7からのEcoRI /NsiI断片および pTUCU5からのNsiI /EcoRI断片を、前もってEcoRIで切断したプラスミド pTZ18U内にクローン化する。このようにしてプラスミド pTUCU10が得られる。プラスミド pSCU3がプラスミド pTUCU10のXhoI/BclI断片およびプラスミド pTUCU7のBglIII /PstI断片を、前もってXhoI/PstIで切断したプラスミド pGY1中にクローニングすることにより形成される。

20【0324】13. 2. 3. プラスミド pSCU6

プラスミド pTUCU6が、pTUCU10からのXhoI /BclI断片およびpTUCH10からのBglIII /PstI断片を、前もってXhoI/PstIで切断したプラスミド pGY1中にクローニングすることにより得られる。

【0325】プラスミド pSCU3およびpSCU6は今、対照のプラスミド pSCU1と比較して、以下のヌクレオチド配列 [5' → 3'] を有する3'末端標的性配列を含む:



野生型と比較して変化している (突然変異している) ヌクレオチドはボールド体で示され、下線を付してある。挿入により新たに導入されたヌクレオチドはイタリック体で示してある。

【0326】実施例14: pSCMおよびpSCU構築物の二元植物ベクター内へのスプライシング

14. 1: プラスミド pCIB200の構築

この二元ベクターの構築は、PK2 [2] の誘導體である文献 [56] に記載されたプラスミド pTJS75を基にしており、該二元ベクターは広い宿主範囲を有し、そしてテトラサイクリン耐性遺伝子を有する。このプラスミドを制限酵素NarIで切断し、そして次にNptI遺伝子を有するpUC4K [70] のAccI断片に連結される。この方法で形成されたプラスミド pTJS75kanはこのときテトラサイクリン耐性遺伝子の他にNptI遺伝子

を含み、次に制限酵素SalIで消化される。

【0327】同時に、文献 [53] に記載されているプラスミド pCIB7をEcoRVで切断し、そしてアグロバクテリウム・チュメファシエンスのTiプラスミドからの左側および右側のT-DNA境界配列ならびにキメラNos/NptII 遺伝子およびpUCポリリンカー領域を含む生成EcoRV断片をXhoIリンカーと連結する。

【0328】生成する構築物は次にXhoIで消化され、そしてプラスミド pTJS75kanのSalI切断部位にクローン化される。遺伝子地図が図1に示される生成するプラスミドをpCIB200と記載する。

【0329】14. 2: pCIB200内へのEcoRI断片のクローニング

プラスミド pCIB200を最初にEcoRIで切断する。次に以下のEcoRI断片を切断されたpCIB200内に

クローン化する：

pSCH10のEcoRI断片 → pSCH12
 pSCM3のEcoRI断片 → pSCM13
 pSCU1のEcoRI断片 → pSCU11
 pSCU3のEcoRI断片 → pSCU13

【0330】IV. タバコプロトプラストでの形質転換

上記のプラスミドは「一時的発現系」を用いてニコチアナ・ブルムバギニホリアのプロトプラストにおいて試験管内で試験される。

実施例15：ニコチアナ・ブルムバギニホリアのプロトプラストの生成および培養

ニコチアナ・ブルムバギニホリアのプロトプラストの生成および培養はタバコに対して記載された操作〔項3参照〕と同様に公知方法により行われる。詳細な記載は文献〔60〕または〔44〕に見出されるであろう。

【0331】実施例16：プロトプラストの形質転換

ニコチアナ・ブルムバギニホリアのプロトプラストの形質転換は文献〔44〕に記載の方法に従って行われる。上記の方法に従って生成されたプロトプラストを最後の精製段階の後、以下の組成：

マンニトール 0.4M
 CaCl₂ 14-30mM
 MES 0.1% (w/v)

を有する溶液中に懸濁する。プロトプラスト濃度は1.6-2×10⁶/mlである。

【0332】このプロトプラスト懸濁液3mlをまず15mlの遠心管中で殺菌水性懸濁液の形態にあるプラスミドDNA5μgと混合する〔47〕。数分後、ポリエチレングリコール溶液〔0.4Mマンニトール, 0.1M Ca(NO₃)₂, pH7.0中の40% (w/v) PEG6000〕0.3mlを混合物に添加し、そしてそのバッチを注意深く混合する。さらに数分後、K3培地〔Z Pflanzenphysiol, 78:453-455(1976); Shillito等(1981)〕4mlを添加し、そして遠心管を24時間暗所において25℃ないし27℃で保温する。

【0333】プロトプラストのペレット形成性を改良するために、W5塩溶液〔44〕(5.4ml)を次に添加してもよい。次いでプロトプラストを低速遠心分離する(約60-100×g)。上澄みの一部を引き続くキチナーゼ活性の分析のために分離し、そして残りを廃棄する。分別されたプロトプラストを残りの培地中に再懸濁し、そしてエペンドルフチューブに移し、そこで容量をおおよそ決定する。この懸濁液の一部をキチナーゼ活性の分析およびウエスタンブロットのために使用する。

【0334】ニコチアナ・ブルムバギニホリアのプロトプラストのプラスミドpCIB1005BおよびpCIB1005BΔVTPでの形質転換は文献〔19〕による変形された「ネグルチウ」の方法に従って行われ得る。

【0335】V. 形質転換およびトランスジェニック植物の作出

実施例17. 1：アグロバクテリウム・チュメファシエンスの二元ベクターでの形質転換

上の実施例14に記載された二元ベクターを以下の方法に従ってアグロバクテリウム・チュメファシエンスLB4404株内に形質転換する。アグロバクテリウム・チュメファシエンスLBA4404株はT-DNA領域を欠いているが、完全なvir領域を依然として有する欠矢Tiプラスミドを含む〔24〕。

【0336】アグロバクテリウム・チュメファシエンスLB4404株をMG/L培地〔VII項参照〕5ml中の一晩培養液中30℃の温度で培養する。MG/L培地250mlをこれらの5mlの一晩培養液中に添加し、そして全体のバッチを光学密度OD=0.6(600nm)が得られるまで十分に混合する。次いで細胞を8000×gでの遠心分離により集め、そしてMG/L培地5ml中に再懸濁する。この細胞懸濁液200μlをMG/L培地中の二元プラスミドDNA0.2μgないし1μgと保温し、そしてゆっくり混合した後、バッチをすぐにドライアイス/エタノール浴中で急速冷凍する。5分後、試験管を37℃の水浴中に置き、そこに5分間放置する。MG/L培地2mlを次に添加する。この懸濁液を次に30℃の水浴で2ないし3時間保温する。細胞を次に遠心分離により集める。細胞を少量のMG/L培地に再懸濁し、次に選択培地(ゲンタマイシン100μg/mlを含むMG/Lプレート)上に置く。最初のコロニーは30℃で2ないし3日後に現れる。

【0337】実施例17. 2：アグロバクテリウム・チュメファシエンスの二元ベクターでの形質転換

別の実施態様において、上の実施例14に記載された二元ベクターを、tra機能を備えたプラスミドを有する大腸菌ヘルパー株を用いて三親交雑法〔52〕によりアグロバクテリウム・チュメファシエンスLBA4404株内に導入する。使用される大腸菌ヘルパー株は、例えば二元ベクターの導入に必要なtra機能を有するプラスミドpRK2013を含む大腸菌BHB1011であってよい。

【0338】アグロバクテリウム・チュメファシエンスLBA4404株はリファムピシン20mg/lおよびストレプトマイシン500mg/lを含むLB培地中28℃で一晩培養される。大腸菌BHB1011および二元ベクターを有する大腸菌株はカナマイシン25mg/lを含むLB培地中37℃で一晩培養される。これらの培養液各1mlを8000×gで遠心分離し、1mlの滅菌水または10mM MgSO₄で洗浄し、再び遠心分離し、そして100μlの水またはMgSO₄溶液中に再懸濁する。LB固体培地を含むプレートを4区画に分ける。これらの4区画のうちの3区画において2つの培養液からなる3種の可能な組合せが混合されるように、

3つの細菌培養液の滴を前記区画に載せる。これらは対照として作用する。しかしながら第4の区画では3つの培養液全てが一緒に混合される。滴が乾燥した後、プレートを28℃で一晩保温する。次に試料を各区画から採取し、そして水またはMgSO₄溶液中に懸濁する。これらの懸濁液の希釈物を調製し、そしてリファムピシン20mg/l、ストレプトマイシン500mg/lおよびカナマイシン25mg/lを含むLB培地にプレーティングし、そして約28℃で2ないし3日培養する。高希釈の三親ハイブリッド〔同様の希釈の対照ハイブリッドでは何も増殖しない〕で増殖するコロニーは個々のコロニーのプレーティングを繰り返すことにより依然として存在し得る親細菌が除去される。

【0339】実施例18：ニコチアナ・シルベストリスおよびニコチアナ・タバカムの葉ディスク形質転換

葉ディスク形質転換は文献〔27〕に記載された方法に従って実質的に行われる。アグロバクテリウム・チュメファシエンスLBA4404株(pSCH12; pSGL7)をリファムピシン20mg/l、ストレプトマイシン500mg/lおよびカナマイシン25mg/lで富化され、pH5.6に調整されたグルタミン酸塩培地中28℃で一晩培養する。約3.3×10⁸細胞を含有するこの一晩培養液中で、ニコチアナ・シルベストリスまたはニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425の滅菌葉ディスク(直径5mmないし10mm)が5分間培養される。ディスクを次に培養液から除去し、滅菌ペーパータオルで軽くたたいて乾燥させ、その後栄養培地を含む直径100mmのペトリ皿に移す。

【0340】この栄養培地は、1%寒天(DIFCO)で固化され、そしてその他の添加剤としてpH指示剤(クロロフェノールレッド; 5mg/l)および植物生長剤カイネチン(0.3mg/l)およびα-ナフチル酢酸(2mg/l)を含有する文献〔33〕による基本培地(30ml)からなる。この寒天培地(培地A)はニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425〔12〕の髓組織から誘導されたS275N細胞の2週令懸濁培養液1mlないし2mlの層で覆われており、そして口紙(No.1ホワットマン口紙)で覆われている。上記のように前処理した葉ディスクを次に口紙上に載せる。

【0341】48時間後、苗条誘導のために、同一組成を有するセフォタキシム350mg/lおよびカナマイシン100mg/lを含有する選択培地(培地B)上に載せ、25℃および散光(80ないし100μアインシュタイン)中で外植片を培養する。共培養された対照組織はカナマイシンを含まない同様の培地上に接種される。外植片は1週間間隔で新鮮な培地Bに移される。

【0342】4ないし8週の共培養後、外植片から発生する未熟苗条を収穫し、そして50mlの容器中の培地C(0.6%フィトアガーを含有する固体地)25ml上に移す。全体の組織を24℃ないし28℃の温度、8

0ないし100μアインシュタインの光強度で培養する。1ないし2週間後苗条は根を形成する。

【0343】VI. トランスジェニック植物材料の分析

(A) 液相局在の間接的証明

実施例19：形質転換されたプロトプラストの分析

形質転換されたプロトプラストの分析は項17および20.3に詳細に記載された方法に従って行われる。

【0344】19.1：キチナーゼ活性

表1の活性データからわかるように、対照プロトプラストは内因性キチナーゼ活性を有するけれども、わずかな活性だけが上澄み中に示され得る。

【0345】これに対し、タバコキチナーゼの全ての構築物はペレットおよび上澄みの両方に著しく高められた全活性を示す。試験された全てのの上澄み試料中のキチナーゼ活性の全般的な増加は細胞の貯蔵系の過剰保持におそらく原因がある。しかしながら、著しい相違が見られる：構築物pSCH10、pSCM22、pSCM23およびpSCM24の場合、ペレット中のキチナーゼ活性は対照のものに比べ3-4倍高い。しかしながら、pSCM3の場合、ペレット中のキチナーゼ活性は35%だけ高められている。キュウリキチナーゼ構築物pSCU1、pSCU3およびpSCU6の場合、ペレット中のキチナーゼ活性は対照に比べて10-20%高いだけであるが、上澄み中の活性は7ないし8のファクターで(pSCU3の場合は4のファクターで)高い。表1に示された結果はウエスタンブロットの結果により確認される。キュウリキチナーゼ構築物に対するウエスタンブロットデータは、例えば、pSCU1(野生型)の場合にはごくわずかのキチナーゼが形質転換されたプロトプラスト中に存在するだけであるのに対し、pSCU3およびpSCU6で形質転換されたプロトプラストは非常に高いキチナーゼ濃度を有することを明らかに示している。

【0346】19.2：グルカナーゼ活性

対照プロトプラストで得られた結果(表10参照)は、ニコチアナ・ブルムバギニホリアからのβ-1,3-グルカナーゼが細胞内に保持されることを示す。

【0347】匹敵する結果を無傷の構築物(pCIB1005B)で得ることができ、この場合、プロトプラスト抽出物中により強いシグナルが観察されるにすぎない。このことは、タバコグルカナーゼがプロトプラスト中にも保持され、それ故に細胞の区画内に正確に方向づけられることを示す。

【0348】しかしながら、C末端範囲を欠失させるか、不活性化させた構築物(pCIB1005B6VTP)が使用される場合、β-1,3-グルカナーゼが培養培地中に分泌される。

【0349】実施例20：形質転換された植物の分析

実施例18に従って形質転換された植物体は以下の方法により分析される。

【0350】20.1:細胞内液(ICF)の抽出

植物組織から細胞内液の抽出は、文献〔46〕に記載された方法に従って行われ得る。この方法において再生されたトランスジェニック植物の葉は最初に集められ、そ*

0.5Mシヨ糖を含むトリスHCl (pH7.8)	25.0mM
MgCl ₂	10.0mM
CaCl ₂	10.0mM
フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)	0.5mM
2-メルカプトエタノール	5.0mM

を有することが有利である。

【0351】また、50mMクエン酸緩衝液(pH5.5)を使用することも可能である。操作は室温で行われてもよい。

【0352】真空を解除すると緩衝液は葉を貫通する。葉片を次に注意深く乾燥し、そして20mlのシリンジに移す。シリンジは遠心管内で懸濁され、そして低速(約1000×g)および低温(4℃)で10分間遠心分離される。

【0353】20.2:細胞内タンパク質画分の抽出

項20.1に従って処理された葉片を次に同様の緩衝液中でホモジナイズする。粗い粒子を遠心分離により除去する。

【0354】20.3:キチナーゼ活性の決定

2つの抽出物のタンパク質濃度はブラッドフォード法に基づいたバイオラド・プロテイン・アッセイにより決定される。該方法はタンパク質濃度に応じた染料の色変化に基づいている。

【0355】キチナーゼ活性は放射標識(トリチウム化)キチンを用いたバイオメトリックアッセイにより決定され得る〔5〕。タバコキチナーゼ形質転換体に対する結果は表2に示されており、そしてキュウリキチナーゼ形質転換体に対する結果は表3に示されている。

【0356】要するに、プロトプラストおよび植物全体で行われた形質転換実験の結果は、タバコからの塩基性キチナーゼのC末端にある本発明に係るペプチド断片が植物の液胞に特異的にキチナーゼを方向づけるのに関連することを示す。さらに、pSCM22、pSCM23およびpSCM24での結果は、C末端にあるアミノ酸配列内のある種の変異が配列の標的性機能が結果として消失することなしに許されることを示す。3'末端の標的性配列が失われているならば(pSCM3;pSCM13)、そのときは液胞内に存在するキチナーゼの大部分は細胞外空間に分泌される。

【0357】さらに、これらの結果に基づいて、本発明に係るDNA配列が、自然に分泌されるキチナーゼタンパク質が植物細胞、おそらくほとんどが液胞内に保持される異種遺伝子(キュウリキチナーゼ遺伝子;pSCU3;pSCU6;pSCU13)に操作可能に連結されている場合でも標的性シグナルとして作用することを示すことも可能である。

*して4ないし5cm²の薄片に切断され、そしてゆっくりかきまぜながら大過剰の冷緩衝液(約4℃)に各々30秒間真空下で浸漬する。該緩衝液は以下の組成:

10 【0358】(B)液胞局在の直接的証明

実施例21.1:プロトプラストの単離(文献〔42〕に準拠して)

トランスジェニックニコチアナ・シルベストリス植物の葉を1-1.5gの薄片に切断し、そしてペトリ皿のK3M浸透圧調整培地中に入れる。K3MはK3大量成分の濃度の半分(すなわち、1リットルに対し、NaH₂PO₄・H₂O75mg、CaCl₂・2H₂O450mg、KNO₃1250mg、NH₄NO₃125mg、(NH₄)₂SO₄67mg、MgSO₄・7H₂O125mg)およびマンニトール84g、pH5.6を含有し、浸透圧は500mosmに調整されている。葉を次に細片に切断し、そして同じ浸透圧調整培地中で1時間保温する。葉片は次に排水され、そして消化溶液10ml/皿中に入れる。消化溶液はK3M(酵素とともに浸透圧が再び500mosmとなるようにマンニトール75.6gを含む)中に0.4%マセロザイムR10(セルバ)および0.6%セルリシン(カルピオケム)を含む。ペトリ皿をパラフィルムで密封し、そして揺動せずに暗所26℃で一晩保温する。消化を促進するために、葉片はまた2倍の酵素濃度で真空浸透され、そしてわずかに揺動して(30-40rpm)2-3時間保温されてもよい。

【0359】プロトプラストを100μmフィルターに通し、次いで半量の0.6Mシヨ糖ですすぐ。懸濁液を15ml遠心管に移し、K3M2mlの層に覆い、そして1000gで10分間遠心分離する。プロトプラストを界面から吸引により除去し、K3Mで希釈し、そして700gで10分間の遠心分離により除去する。遠心分離により除去されたプロトプラストを次にK3M培地に再懸濁する。

【0360】実施例21.2:液胞の単離(文献〔8〕に準拠して)

20%フィコール含有のK3M培地(pH6.5)中にプロトプラストを再懸濁する。そのうちの2.5mlを遠心管に移し、次いで以下の溶液の連続層で覆う:15%フィコール2ml,DEAEデキストラン(pH6.5)7mg;10%フィコール2ml,硫酸デキストラン(pH8.0)3mg;6%フィコール2ml,硫酸デキストラン(pH8.5)3mg;0%フィコール(pH8.0)約4ml(縁までいっぱいにする)。こ

の管を遠心ローター (SW41. 14, コントロン) 中で最初に3500rpmで15分間、そして次に4000rpmで105分間遠心分離する。液胞を吸引により0-6%フィコール界面から除去する。

【0361】マーカーは文献〔7〕に従って測定される。ヘキソースホスフェートイソメラーゼを測定するために、測定を可能とするには、硫酸デキストランはDEAEデキストランで沈殿されなければならない。ブラッドフェード法によるタンパク質の測定は、ポリ塩基がその測定を妨害するので不可能である。表5の結果は液胞マーカー酵素 α -マンノシダーゼを100%として標準化された。

【0362】表4に示されたキチナーゼ比活性の比較は表2の結果を裏づける。プラスミドpSCM13またはpSCU11でそれぞれ形質転換された植物M13. 4およびU11. 4. 2の場合、キチナーゼの分泌がみられ、一方、プラスミドpSCH12またはpSCU13でそれぞれ形質転換された植物M10. 4およびU13. 15の場合、細胞内局在が明らかに示されている。*

*ウエスタンブロットは、内因性ニコチアナ・シルベストリスキチナーゼが細胞内に存在し、そしてプロトプラストM13. 4の場合には主な残留活性に関連することを裏付ける。

【0363】植物体M10. 7. 4およびU13. 15からのプロトプラストを単離することは可能だった。種々のマーカーの測定 (表5) はC末端配列を有するキチナーゼの液胞中の局在を裏付ける。この場合もまた、ウエスタンブロットはこの局在を裏付ける。内因性キチナーゼは同様に液胞中に局在している。

【0364】1またはそれ以上の自家受粉植物の種子が全ての系から得られた。キチナーゼ過産生および局在が引き続く世代に受け継がれることを証明することができた。

【0365】寄託

以下の菌株はブダペスト条約の要求に従って米国メリーランド州ロックヴィレにあるアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された。

プラスミド	寄託日	寄託番号(ATCC)
pBscucchi/chitinase (略称: pBSCucCht5)	1988年12月29日	40528
pBSGluc39.1	1988年12月29日	40526
pCIB1005B	1990年 3月13日	40770

【0366】培地および緩衝液

培地A

NH ₄ NO ₃	1650mg/l
KNO ₃	1900mg/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370mg/l
KH ₂ PO ₄	170mg/l
Na ₂ EDTA	37.3mg/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8mg/l
H ₃ BO ₃	6.2mg/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6mg/l
KI	0.83mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025mg/l

※ショ糖

チアミンHC1	30.0g/l
30 ミオイノシトール	0.400mg/l
カイネチン	100.0mg/l
α -ナフチル酢酸	0.3mg/l
クロロフェノールレッド	2.0mg/l
5.0mg/l	5.0mg/l
寒天	10.0g/l

培地B

培地Aと同じ組成であるが、 α -ナフチル酢酸を含まず、以下の追加の成分を含む。セファタキシム
500mg/l

カナマイシン 75mg/l

40 培地C

培地Bと同じ組成であるが、カイネチンを含まない。アグロバクテリウム用のMG/L培地

L-プロス

50%

マンニトール-グルタメート培地 [Holsters等(1978)]

50%

K3M浸透圧調整培地 [500mOsm; pH5.6]

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	75mg/l	(NH ₄) ₂ SO ₄	67mg/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	450mg/l	MgSO ₄ · 7H ₂ O	125mg/l
KNO ₃	1250mg/l	マンニトール	84g/l
NH ₄ NO ₃	125mg/l	W5塩溶液	
		50 NaCl	154mM

73

74

CaCl ₂ · 2H ₂ O	125mM	EDTA	10mM
KCl	5mM	NP-40 (シグマ・ケミカル)	1% (v/v)
ブドウ糖	5mM	TBE緩衝液	
pH5.6-6.0		トリス-ホウ酸塩	89mM
<u>すすぎ溶液I</u>		ホウ酸	89mM
シヨ糖	154.0g/l	EDTA	2mM
MES	0.59g/l	TE緩衝液	
KNO ₃	250.0mg/l	トリスHCl (pH8.0)	10mM
NH ₄ NO ₃	25.0mg/l	EDTA	1mM
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	15.0mg/l	SSC	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	90.0mg/l	NaCl	1.54mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	25.0mg/l	クエン酸ナトリウム	0.154mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	13.4mg/l	(pH7.0)	
TENP緩衝液		[0367]	
トリスHCl (pH8.0)	100mM		

表

表1: ニコチアナ・ブルムバギニホリアのプロトプラストにおける一時的発現後のキチナーゼ活性

プラスミド	上澄み		プロトプラスト	
	ncat/バッチ	±SD	ncat/バッチ	±SD
-	.07	.01	.81	.04
pGY1	.10	.00	.81	.02
pSCH10	2.05	.05	2.95	.08
pSCM3	2.10	.09	1.08	.01
pSCM22	1.64	.10	2.59	.04
pSCM23	2.65	.34	2.64	.14
pSCM24	1.55	.03	2.12	.52
pSCU1	.70	.02	.76	.01
pSCU3	.38	.02	.87	.05
pSCU6	.87	.09	.92	.04

表2: トランスジェニック植物におけるタバコキチナーゼ活性

プラスミド	植物	ホモジネート [タバコ質][キチナーゼ]比活性				細胞内液 [タバコ質][キチナーゼ]比活性				% in ICF
		mg/ml	ncat/ml	ncat/mg	ncat/gFW	mg/ml	ncat/ml	ncat/mg	ncat/gFW	
pCIB200	C10	4.00	8.9	2.2	44.3	0.28	3.0	10.5	.6	1%
pCIB200	C11	1.87	6.7	3.6	33.3	0.18	1.4	8.0	.3	1%
pSCH12	M10.2	0.30	72.6	245.1	363.1	0.38	127.7	340.0	25.5	7%
pSCH12	M10.3	0.61	229.2	375.5	1146.1	0.39	41.3	104.6	8.3	1%
pSCH12	M10.7	2.26	233.2	103.3	1166.2	0.19	39.2	207.3	7.8	1%
pSCH12	M10.13	2.07	342.6	165.9	1713.1	0.21	108.9	516.1	21.8	1%
pSCH12	M10.16	2.26	261.5	115.7	1307.7	0.17	43.4	249.7	8.7	1%
pSCH12	M10.18	1.87	252.2	134.6	1260.8	0.46	46.3	101.3	9.3	1%
pSCM13	M13.2	0.85	299.2	351.3	1496.2	2.55	2462.1	964.6	492.4	25%
pSCM13	M13.4	0.89	196.6	221.9	983.2	2.31	1922.0	830.6	384.4	28%
pSCM13	M13.5	0.64	133.4	209.2	666.8	2.18	1581.5	724.9	316.3	32%
pSCM13	M13.6	0.60	160.9	270.4	804.6	1.81	1584.9	876.1	317.0	28%
pSCM13	M13.10	0.44	1.8	4.1	9.1	0.42	42.2	100.5	8.4	48%

表3: トランスジェニック植物におけるキュウリキチナーゼ活性

75

76

構築物	植物	ホモジネート				ICF				% in ICF
		mg/ml	ncat/ml	ncat/mg	ncat/gFW	mg/ml	ncat/ml	ncat/mg	ncat/gFW	
pCIB200	C10	4.0	.8	.2	.10	.28	3.1	11.2	.28	74 %
pCIB200	C11	1.87	.6	.3	.19	.18	.90	4.9	.45	71 %
pSCU11	U11.1	3.77	3.4	0.9	.84	.19	39.6	207.4	18.06	96 %
pSCU11	U11.2	2.15	2.1	1.0	4.72	.32	39.3	122.4	8.99	66 %
pSCU11	U11.3	.83	1.70	2.06	2.59	.20	12.86	63.63	7.50	74 %
pSCU11	U11.4		.11		.19		.86		.37	66 %
pSCU11	U11.5	.37	1.06	2.89	1.57	.21	11.68	56.41	4.92	76 %
pSCU13	U13.1	1.98	4.5	2.3	2.75	.18	4.2	23.0	.48	15 %
pSCU13	U13.2	.49	2.19	4.50	3.71	.29	4.94	17.01	2.01	35 %
pSCU13	U13.3	.48	5.79	12.12	9.53	.19	1.27	6.82	.69	7 %
pSCU13	U13.5	3.85	17.8	4.6	2.64	.20	2.5	12.0	.43	14 %
pSCU13	U13.15	1.98	.67	.34	1.35	.13	1.10	8.19	.22	14 %

表4：トランスジェニック植物のプロトプラストにおけるキチナーゼ活性

プラスミド	植物	ホモジネート			プロトプラスト			プロトプラスト中の%
		[タンパク質]	[キチナーゼ]	[比活性]	[タンパク質]	[キチナーゼ]	[比活性]	[%]
		mg/ml	ncat/ml	ncat/mg	mg/ml	ncat/ml	ncat/mg	%
pSCH12	M10.4	0.98	153	157	0.13	22.6	173.7	111
pSCM13	M13.4	1.19	183	153	0.23	4.5	19.2	13
pSCU11	U11.4.2	2.40	10.2 ^a	4.25	2.13	0.23 ^a	0.11	2.6
pSCU13	U13.15	0.75	24-4 ^a	32.5	0.25	12.0 ^a	48.0	148

a 活性は抗タバコキチナーゼ抗体 2 μ l の存在下で測定された

表5: キチナーゼ過産生植物からの液胞調製物における細胞内マーカーの局在

実験1. C末端配列を有するタバコキチナーゼの局在 (植物M10. 7. 4)			
マーカー	単位 ^a / 10 ³ プロトプラスト	単位 / 10 ⁶ 液胞 ^b	液胞中の 全体の%
α -マンノシダーゼ	89	89	100%
タバコキチナーゼ	66300	75100	113%
ヘキソース6-ホス			
フェートイソメラーゼ	2640	170	6%
葉緑素	27	<4.5	<17%
実験2. タバコキチナーゼのC末端配列を有するキュウリキチナーゼの局在 (植物U13. 15)			
マーカー	単位 ^a / 10 ³ プロトプラスト	単位 / 10 ⁶ 液胞 ^b	液胞中の 全体の%
α -マンノシダーゼ	59	59	100%
タバコキチナーゼ	12000	12200	102%
ヘキソース6-ホス			
フェートイソメラーゼ	490	90	18%
葉緑素	62	<2.2	<4%

a: 酵素に対してp cat, 葉緑素に対して μ g

b: α -マンノシダーゼ100%に対して標準化された値

表6: 自家受粉されたトランスジェニック植物の第1世代におけるカナマイシン耐性の分離 (3KanR: 1KanSが期待される)

プラスミド	親植物	KanR	KanS
pCIB200	C2	—	—
	C4	39	11
pSCH12	M10. 3	27	12
	M10. 7	36	14
	M10. 13	39	9
pSCM13	M13. 2	37	11
	M13. 4	39	14
	M13. 7	—	—
	M13. 10	24	12
pSCU11	U11. 3	33	13
	U11. 4	15	39

	U 1 1 . 5	3 6	1 1
--	-----------	-----	-----

表7：トランスジェニック植物の後代の分析

(K a n R 植物だけが試験された)

ホモジナイズされた葉中の濃度

プラスミド	親 植 物	植 物	mg/ml	ncat/ml	ncat/mg
pCIB200	C2	C2.1	2.77	27.3	9.9
		C2.2	2.23	21.7	9.8
		C2.3	2.01	42.5	21.1
	C4	C4.1	2.88	8.3	2.9
		C4.2	2.82	9.6	3.4
		C4.3	2.15	6.1	2.8
		C4.4	2.66	7.2	2.7
	pSCH12	M10.3	M10.3.1	1.59	243.4
M10.3.2			1.82	179.0	98.3
M10.3.3			2.96	212.4	71.7
M10.3.4			1.80	163.9	91.1
M10.7		M10.7.1	1.92	196.5	102.1
		M10.7.3	1.72	148.2	86.3
		M10.7.4	2.23	112.5	50.5
M10.13		M10.13.1	2.81	283.6	100.8
		M10.13.2	2.52	217.6	86.5
pSCM13		M13.2	M13.2.1	1.43	330.1
	M13.2.2		1.03	8.5	8.2
	M13.2.3		2.15	65.9	30.7
	M13.2.4		1.15	1.1	.9
	M13.4	M13.4.1	1.78	332.7	186.7
		M13.4.3	2.86	357.8	124.9
		M13.4.5	1.14	11.0	9.7
		M13.4.6	1.64	324.7	198.6
	M13.7	M13.7.3	2.60	259.3	99.9
	M13.10	M13.10.1	1.83	235.1	128.6
		M13.10.2	2.89	153.1	52.9
		M13.10.3	2.53	504.9	199.3

表8：トランスジェニック植物の後代の分析

(K a n R 植物だけが試験された)

30

ホモジナイズされた葉中の濃度

プラスミド	親 植 物	植 物	mg/ml	ncat/ml	ncat/mg
pCIB200	C2	C2.1	2.77	4.40	1.59
		C2.2	2.23	4.06	1.82
		C2.3	2.01	4.95	2.46
PSCU11	U11.3	U11.3.1	2.52	7.38	2.93
		U11.3.2	2.14	7.69	3.59
	U11.4	U11.4.1	1.87	35.58	19.05
		U11.4.2	1.81	46.75	25.77
	U11.5	U11.5.1	2.30	6.95	3.02
		U11.5.2	2.79	13.88	4.98

キチナーゼ活性はタバコキチナーゼに対する免疫グロブリンの存在下で測定された。

表9：トランスジェニックF1植物におけるキュウリキチナーゼ活性

構築物	親植物	植物	ホモジネート				ICF				% in ICF
			mg/ml	ncat/ml	ncat/mg	ncat/gFW	mg/ml	ncat/ml	ncat/mg	ncat/gFW	
pCIB200	C4	C4.2	3.11	5.10	1.64	6.80	.10	.50	5.30	.28	74 %
pSCU11	U11.3	U11.3.2	1.49	1.10	.74	2.90	.24	26.67	111.12	18.06	96 %
pSCU11	U11.4	U11.4.1	1.63	13.70	8.40	37.80	.56	19.07	33.99	8.99	66 %
pSCU11	U11.4	U11.4.2	1.58	11.60	7.34	37.10	.31	12.86	41.76	7.50	74 %

表10: ニコチアナ・ブルムバギニホリアのプロトプラストにおける³⁵S標識された成熟β-1, 3-グルカナーゼの活性

プラスミド	プロトプラスト抽出物	保温培地
-	中間	痕跡
pCIB1005B	強い	痕跡
pCIB1005BΔVTP	中間	中間

[0368] 参考文献一覧

- Allen G, "Sequencing of proteins and peptides", in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 8, eds. TS Work and RM Bordon, Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1981).
- An G et al, EMBO J., **4**: 277-284 (1985).
- Birk Y et al, Biochim. Biophys. Acta, **67**: 326-328 (1963).
- Schlmann et al, EMBO J, **7**: 1559-1565 (1988).
- Boller T et al, Planta, **157**: 22-31 (1983).
- Boller T and Wienken A, Ann Rev Plant Physiol, **37**: 137-164 (1986).
- Boller T and Kende H, Plant. Physiol., **63**: 1123-1132 (1979).
- Boudet AM and Alibert G, Math. Enzymol., **148**: 74-81 (1987).
- Cashmore A, Genetic Engineering of Plants, an Agricultural Perspective, Plenum, New York 1983, pages 29-38.
- Devereux et al, Nucl. Acids Res., **12**: 387-395 (1984).
- Erllich et al, PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton Press, New York (1989).
- Eichholz R et al, Planta, **158**: 410-415 (1983).
- Facciotti and Pilet, Plant Science Letters, **15**: 1-7 (1979).
- Felix G and Meins FJR, Planta, **164**: 423-428 (1985).
- Frank G et al, Cell, **21**: 285-294 (1980).
- Gardner RC et al, Nucl. Acids Res., **9**: 2871-2888 (1981).
- Garfinkel and Neeter, J. Bact., **144**: 732-743 (1980).
- Glover DM, DNA cloning, volume 1: a practical approach, DM Glover ed., IRL Press, Oxford and Washington DC, p. 33 (198).
- Goodall Get al, Methods in Enzymology, **181**: 148-161 (1990).
- Grimsley NE et al, Nature, **325**: 177-179 (1987).
- Gubler U and Hoffman BJ, Gene, **25**: 263 (1983).
- Haynes BT et al, Nucleic Acid Hybridisation a Practical Approach, IRL Press, Oxford, England (1985).
- Bilder et al, Nature, **330**: 160-163 (1987).
- Bookema et al, Nature, **303**: 179-186 (1983).
- Bohn T et al, in: "Molecular Biology of Plant Tumors", Academic Press, New York, pp. 549-560 (1982).

26. Horn et al, *Plant Cell Reports*, **7**: 469-472 (1988).
27. Horsosh et al, *Science*, **227**: 1229 (1985).
28. Howard et al, *Planta*, **170**: 535 (1987).
29. Innis et al, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., New York, 1990
30. Lagrimini LM et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **84**: 7542, (1987).
31. Laurell and McKay, *Methods Enzymology*, **73**: 339-361 (1981).
32. Lathé R et al, *J. Mol. Biol.*, **183**: 1-12 (1985).
33. Linsmaier and Skoog, *Physiol. Plant.*, **18**: 101-127 (1965).
34. Maniatis et al, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
35. Matsuoka K and Nakamura K, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **88**: 834-838 (1991)
36. Maxam and Gilbert, 'Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavage', in: *Methods in Enzymology* **65**: 499-560, Academic Press, New York, London, (1980).
37. Meins & Lutz, *Differentiation*, **15**: 1-6 (1979).
38. Métraux JP et al, *Physiol Mol Plant Pathol.*, **33**: 1-9 (1988).
39. Mohnen, "Regulation of Glucanohydrolases in *Nicotiana tabacum* on the messenger RNA level", Dissertation University of Illinois at Urbana-Champaign, 1985.
40. Mohnen et al, *EMBO J.*, **4**: 1631-1635 (1985).
41. Morelli et al, *Nature*, **315**: 200 (1985).
42. Müller JP et al, *Physiol. Plant.*, **57**: 35-41 (1983)
43. Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497 (1962).
44. Negrutiu I et al, *Plant Mol. Biol.*, **8**: 363-373 (1987).
45. Neuhaus et al, *Theor. Appl. Genet.*, **74**: 30-36 (1987).
46. Parent and Asselin, *Can J Bot.*, Vol **62**: 564-569 (1984).
47. Paszkowski Jet al, *EMBO J.*, **3**: 2717 (1984).
48. Petit et al, *Mol. Gen. Genet.*, **202**: 308 (1986).
49. Pietrzak et al, *Nucl. Acids Res.*, **14**: 5857-5868 (1986).
50. Potrykus I and Shillito RD, *Methods in Enzymology*, Vol **118**, Plant Molecular Biology, eds. A and H Weissbach, Academic Press, Orlando, 1986.
51. Rhodes et al, *Biotechnology*, **6**: 56-60 (1988).
52. Rogers SG et al, *Methods in Enzymology*, **116**: 630-633 (1986).
53. Rothstein SJ et al, *Gene*, **53**: 153-161 (1987).
54. Sambrook et al, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition (1989)
55. Sanger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **74**: 5463-5467 (1977).
56. Schmidhauser and Helinski, *J. Bacteriol.*, **164**: 446-455 (1985).
57. Schocher RJ et al, *Bio/Technology*, **4**: 1093-1096 (1986).
58. Selstad et al, *Infection and Immunity*, **55**: 2281-2286 (1987)
59. Shillito et al, *BioTechnology*, **3**: 1099-1103 (1985).
60. Shillito RD and Potrykus I, In: *Methods in Enzymology*, eds. Wu R and Grossman L, Academic Press, Orlando, Florida, Vol. **153**: 313-306 (1987).
61. Shillito RD et al, *Biotechnology*, **7**: 581-587 (1989).
62. Shinshi et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **84**: 89-93 (1987).
63. Shinshi et al, *Planta*, **164**: 423-428 (1985).
64. Shinshi et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **85**: 5541-5545 (1988).
65. Simpson RJ and Nice, *Biochem Intl*, **8**: 787 (1984).
66. Southern EM, *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517 (1975).
67. Spena et al, *EMBO J.*, **4**: 2736 (1985).
68. Tague BW and Chrispeels MV, *J Cell Biol.*, **105**: 1971-1979 (1987).
69. Terry et al, *J. Biol. Chem.*, **263**: 5745-5751 (1988)
70. Vieira and Messing, *Gene*, **19**: 259-268 (1982).
71. Wang Y-C et al, *Plant Mol. Biol.*, **11**: 433-439 (1988).
72. Wang et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **66**: 9717-9721 (1989)
73. Yamada Y et al, *Plant Cell Rep.*, **5**: 85-88 (1986).
74. Yanisch-Parron et al, *Gene*, **33**: 103-119 (1985).

WO 89/1 1291	EP-A 0,332,104
WO 86/0 4356	EP-A 0,392,225
WO 88/0 5826	
WO 89/0 4371	
US-P4,810,777	

【配列表】

【0369】配列番号：1

配列の長さ：39

配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）

配列の種類：遺伝コードの縮重に基づいて作成されたハイボセティカル配列

特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連するシグナルペプチドをコードする

配列

CGN/AGR TCN/AGW TTY GGN AAY GGN CTN/TTR TTR/CTN GT
N GAY ACN ATG TAA

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val
Asp Thr Met End

【0370】配列番号：2

配列の長さ：39

配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）

配列の種類：mRNAからのcDNA

起源

生物名：ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)

直接の起源

クローン名：pCHN48

特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連する
シグナルペプチドをコードする

配列

AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTCGAT ACT ATG TAA

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu ValAsp Thr Met End

【0371】配列番号：3

配列の長さ：39

配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）

配列の種類：mRNAからのcDNA（オリゴヌクレオ
チド仲介突然変異誘発により突然変異させた）

起源

生物名：ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)

直接の起源

クローン名：pCHN48

特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連する
シグナルペプチドをコードする 30

配列

AGG TCT TTT GGA AAA GAT CTT TTA GTCGAT ACT ATG TAA

Arg Ser Phe Gly Lys Asp Leu Leu ValAsp Thr Met End

【0372】配列番号：4

配列の長さ：39

配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）

配列の種類：mRNAからのcDNA（オリゴヌクレオ
チド仲介突然変異誘発により突然変異させた） 40

起源

生物名：ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)

直接の起源

クローン名：pCHN48

特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連する
シグナルペプチドをコードする

配列

AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTCAAT ACT ATG TAA

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu ValAsn Thr Met End

【0373】配列番号：5

配列の長さ：39

配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）

配列の種類：mRNAからのcDNA（オリゴヌクレオ
チド仲介突然変異誘発により突然変異させた）

起源

生物名：ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)

10 直接の起源

クローン名：pCHN48

特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連する
シグナルペプチドをコードする

配列

AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTCCGT ACT ATG TAA

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu ValArg Thr Met End

【0374】配列番号：6

20 配列の長さ：40

配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）

配列の種類：mRNAからのcDNA（オリゴヌクレオ
チド仲介突然変異誘発により突然変異させた）

起源

生物名：ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)

直接の起源

クローン名：pCHN48

特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連する
シグナルペプチドをコードする

配列

A/T GAT CTT TTG GGA AAT GGA CTT TTAGTC GAT ACT ATG
TAA

Asp Leu Leu Gly Asn Gly Leu Leu ValAsp Thr Met End

【0375】配列番号：7

配列の長さ：30

配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）

配列の種類：mRNAからのcDNA（オリゴヌクレオ
チド仲介突然変異誘発により突然変異させた）

起源

生物名：ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum) /
キュウリ

直接の起源

クローン名：pCHN48 / pBSCuccht5

特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連する
シグナルペプチドをコードする

配列

ATC GGT GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATGTAA

Ile Gly Asp Leu Leu Val Asp Thr MetEnd

50 【0376】配列番号：8

配列の長さ：21
 配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）
 配列の種類：mRNAからのcDNA（配列番号：2に示された配列の断片）
 起源
 生物名：ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)
 直接の起源
 クローン名：pCHN48
 特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連するシグナルペプチドをコードする
 配列
 CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
 Leu Leu Val Asp Thr Met End
 【0377】配列番号：9
 配列の長さ：24
 配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）
 配列の種類：mRNAからのcDNA（配列番号：2に示された配列の断片）
 起源
 生物名：ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)

10 直接の起源
 クローン名：pCHN48
 特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連するシグナルペプチドをコードする
 配列
 GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
 Gly Leu Leu Val Asp Thr Met End
 【0378】配列番号：10
 配列の長さ：3850
 配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）
 鎖の数：二本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：genomic DNA
 起源
 生物名：ニコチアナ・タバカムの園芸品種ハバナ425(Nicotianatabacum L. c.v. Havana 425)
 直接の起源
 クローン名：1CHN17（1フェージ）
 特性：塩基性キチナーゼ遺伝子
 20 配列

```

GAATTCATC AAAATGTGTT TTCTATATAG GGTCCTCACT ACTAATATAT 50
TGTTATTTTC TAAAGACATA CATGTATACA TGTAATAATT ACCGAACITTT 100
ACGGATGTGG ATAACCCCTC TCGATATAGC ATAGGTCCGC CTCTGATTTA 150
CGAAGGGACA CGAGCAAATT CCTCTATGTA ATTAGTTTTA GCAGTTACAC 200
GTTAAAGTAT AATACATAT TACTTTACCA TAGTTAAGAC CAAACATGTG 250
TATGATTGAC ATACATCTTG CATTCAITAA TTAATTTGAT TTGATCGGAT 300
TAAATTTTT RAGGATAGAG TTTTGTAGTC AAGTTGAGCT AGTGTAACTC 350
TTATAGTCAA TTGGACTCTC TATTACTAGA TACTATATCA GTTCARAAGA 400
CACCAATATC GTATTTTAAAC AGAAGGAGGC AATAAGAAA TTGCAATTC 450
TCAATTCITTT TTAATTAIAT CTAATGAACC AARAGGAGGA AGAGSAGCTA 500
CATATTCGAT TTATAAATAT AAAGCTAGCT GAGGCTCBAATTAATTCTGGA 550

```

89

90

TGCAATACAA GCAATTTACT TAAAACACGA AACAGAAAGS GATTCGGCTC 600
 AAATATCGAC ACCTAASSTT TGAATACAT TACTGAACAA ATTATGAGAT 650
 CATAGACTAG TAATTTAGGA TATTATTCTG TGATTGACTT GATTTTGCAC 700
 ATGAAGAAAC GTGAACGGCT TCTTTTTAG GCCTGCCGTA GAATTGATCA 750
 AAACATATCT CAACATATTA AATAGGGGTC TCAACTAAAC CGGATTCAATG 800
 CCGAATGAGA CCGATTIAAA AGGAGCAGTG GTTCCATTC AAAGAATTAG 850
 ATACATTTCT ACATATTTTT AATTATGAAA ATTACTCCTA TACTAATTTG 900
 TGTGTTTTTA ATCGAATATG TAAATTTTAT TTGAAAATAA AAIAAAAAAT 950
 CACAGTCCAA CTTFIAATCAT AACACTCAA TTRAAATTCAG CTATCTTTCT 1000
 AGGACATAGG AAACATTATC AGTGGAAATA TTATATTATA TCCATAAGAC 1050
 TTTAGCAAAI CCTATAAGAA GTCTAAACAT GTAATTTGACT ACTTTAGAA 1100
 GAGGACTTTA TCTAACCCAA GAARCACTG GCCTAACTCG AATTTGCTTT 1150
 TCCCAAAACC ABAAGTCTAG GAATTAAGCT CCAAATTAAG GACATAGATT 1200
 TTGGCTTACT TTTTTCAAAA AAAAAATAA AATTAATAAT TAAAAATTT 1250
 ITTGTCATG TAATTTAATC AGTTTTTGGG TGAATTTTT TCTTCCACAC 1300
 ACAAGATTTT AACTTTTTTC CAATAAAAA ACACGTCGAA ACATAAAATC 1350
 AAATTTCAGA ACTATTTTTC AACGTAATTI TAAAATTTT ATTTCTAGT 1400
 TTTACTAAA TCTAIGTCTT GATTAAGTCT CCACTCTTAA CTCTTAAAGT 1450
 ATTGAAAATA CATGTTCCAG AATTGCTCTGG GATGAAGCTA AGAGCCGCCA 1500
 TTAAGAAAAA AAATCTAAA ATATATAAAA AGCTAAGAGC CCCCACATAA 1550
 TATAIGTAAAC CTGTGGGGGT AATCTACTGA ATTAATTTTC TGGATAAGAA 1600
 AGATATGACT GAGCTCCGGT TTGCTCATAG ATTTTGACTT TACTTTTTTA 1650
 ATTTCTTTTT GAAAATATG TTGTTTTAAT AAAATATGAT CATGTTTAG 1700
 AAAAAAACA TICAAAAAAC TTCAAGTTCC CAABAGTGT ATGTCCAAAC 1750
 ACAACTTCA AAAATATTT TTTAAAACAA CTTTAAAAAC TTTTTTTTA 1800
 AATTTAATT AAATCTAIGT CCAAACTAGC CGAATTCGA CCTTCTGTTA 1850
 TTCACCAAT TGATTTGCTC AGAAAGTCAAG TCCTCTCAAC AACTAAAAATA 1900
 GACATTAATT AAGCCATGTC TCCAGCATCT TCCTTAGCAA TAAATACCTT 1950
 GCATTTCAAC AGTTTACTAC TACATAAA ATG AGG CT TGT AAA TTC 1997
 Met Arg Leu Cys Lys Phe

ACA GCT CTC TCT TCT CTA CTA TTT TCT CTC CTA CTG CTT TCT 2039
 Thr Ala Leu Ser Ser Leu Leu Phe Ser Leu Leu Leu Leu Ser

GCC TCG GCA GAA CAA TGT GGT TCC CAG GCC GGA GGT GCG CGT 2081
 Ala Ser Ala Glu Gln Cys Gly Ser Gln Ala Gly Gly Ala Arg
 TGT CCC TCG GGT CTC TGC TGC AGC AAA TTT GGT TGG TGT GGT 2123
 Cys Pro Ser Gly Leu Cys Cys Ser Lys Phe Gly Trp Cys Gly

AAC ACC AAT GAC TAC TGT GGC CCT GGC AAT TGC CAG AGC CAG 2165
 Asn Thr Asn Asp Tyr Cys Gly Pro Gly Asn Cys Gln Ser Gln

TGC CCT GGT GGT CCC ACA CCT ACA CCC CCC ACC CCA CCC GGT 2207
 Cys Pro Gly Gly Pro Thr Pro Thr Pro Pro Thr Pro Pro Gly

GCT GCG GAC CTC GGC AGT ATC ATC TCA AGT TCC ATG TTT GAT 2249
 Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ile Ile Ser Ser Ser Met Phe Asp

CAG ATG CTT AAG CAT CGC AIC GAT AAT GCA TGC CAA GGA AAG 2291
 Gln Met Leu Lys His Arg Asn Asp Asn Ala Cys Gln Gly Lys

GGA TTC TAC AGT TAC AAT GCC TTT ATC AAT GCT GCT CCG TCT 2333
 Gly Phe Tyr Ser Tyr Asn Ala Phe Ile Asn Ala Ala Arg Ser

TTT CCT GGC TTT GGT ACC AGT GGC GAT ACC ACT GCC GGT AAA 2375
 Phe Pro Gly Phe Gly Thr Ser Gly Asp Thr Thr Ala Arg Lys

AGA GAA ATC GCG GCT TTC TTT GCT CAA ACC TCC CAT GAA ACT 2417
 Arg Glu Ile Ala Ala Phe Phe Ala Gln Thr Ser His Glu Thr

ACT GGT AAGTCTAGTT ACGTGAACAT AATGATCGT CTTATTCAAA 2463
 Thr Gly

AGTTTAAATCA ATTAGAGAGA TCATACTTTT ATTTAATCAT ACTGGTCTAT 2513
 TCTGATTTCA IGAGACAAAC ACATAGAACT TCCTTTTAAA ATGATTCGCG 2563
 TGAGACTTGA ATTCAAGSACC TCTATCTGCT CATCACTGGA GTATCCAAAT 2613
 TTGAGATATC ACAATGCTTC TTAATTTCCG AAGTTTTTTA TAAGCTGACG 2663
 CCTTCATAAA TTGACCAATGT AACCGTTGAC AGGA GGA TGG GCA ACA 2709
 Gly Trp Ala Thr

GCA CCA GAT GGT CCA TAT GCA TGG GGT TAT TGC TGG CTT AGA 2751

91

Ala Pro Asp Gly Pro Tyr Ala Trp Gly Tyr Cys Trp Leu Arg
 GAA CAA GGT AGC CCC GGC GAC TAC TGT ACC CCA AGT GGT CAG 2793
 Glu Gln Gly Ser Pro Gly Asp Tyr Cys Thr Pro Ser Gly Gln
 TGG CCT TGT GCT CCI GGT CGA AAA IAT TTC GGA CGA CCC CCC 2835
 Trp Pro Cys Ala Pro Gly Arg Lys Tyr Phe Gly Arg Gly Pro
 ATC CAA ATT TCA CAG TAAGTTCCTT CTTACCCACA CGGAGTGTIT 2880
 Ile Gln Ile Ser His
 ACACCAAAGT CGTGGGACGG AATGCTTACT ACCTACTATA TATTTCATTG 2930
 TGAGAGTAGG TACACAATAT CATGATATTT CTATGATTAT AAGAGTATGT 2980
 GATTAATTTTC TATGAGAAAT GTAAAGTTAA ATAGTTTCCA CAACACAAA 3030
 AAAAATGTCAT TT'TTTAACA GATTAAAAA GAAAAGTAT ATCATGAAT 3080
 TGTAGGATCT AATTAAGTGT ATTTTGACAT AAATACAGC AAC TAT AAC 3128
 Asn Tyr Asn
 TAC GGG CCT TGT GSA AGA GCC ATA GGA GTG GAC CTG CTA AAC 3170
 Tyr Gly Pro Cys Gly Arg Ala Ile Gly Val Asp Leu Leu Asn
 AAT CCT GAT TTA GTG GCC ACA GAT CCA GTC ATC TCA TTT AAG 3212
 Asn Pro Asp Leu Val Ala Thr Asp Pro Val Ile Ser Phe Lys
 TCA GCT CTC TGG TTC TGG ATG ACT CCT CAA TCA CCA AAA CCT 3254
 Ser Ala Leu Trp Phe Trp Met Thr Pro Gln Ser Pro Lys Pro
 TCT TGC CAC GAT GTC ATC ATC GGA AGA TGG CAG CCA TCA GCT 3296
 Ser Cys His Asp Val Ile Ile Gly Arg Trp Gln Pro Ser Ala
 GGT GAT CGC GCA GCC AAT CGC CTC CCT GGA TTT GGC GTC ATC 3338
 Gly Asp Arg Ala Ala Asn Arg Leu Pro Gly Phe Gly Val Ile
 ACA AAC ATC ATC AAT GGT GGC TTG GAA TGT GGT CGT GGC ACT 3380
 Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly Leu Glu Cys Gly Arg Gly Thr
 GAC TCA AGG GTC CAG GAT CGC ATT GGG TTT TAC AGG AGG TAT 3422
 Asp Ser Arg Val Gln Asp Arg Ile Gly Phe Tyr Arg Arg Tyr
 TGC AGT ATT CTT GGA GTT AGT CCT GGT GAC AAT CTG GAT TGC 3464
 Cys Ser Ile Leu Gly Val Ser Pro Gly Asp Asn Leu Asp Cys
 GGC AAC CAG AGG TCT TTT CGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT 3506
 Gly Asn Gln Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr
 ATG TAATTCATG ATCTGTTTG TTGATTCOC TTGCAATGCA 3549
 Met
 GGGCCTAGGG CTATGAATAA ACTTAATCTG TCAATCTGAA TGTGTGATTG 3599
 TGACCTGAAG GGATCAGGAC TATAATCGTT TATAATAAAC AARGACTTTG 3649
 TCCCAATATA TGTGTTAATG AGCAATACCTG TAGTTGCTTT AATTCGGCAC 3699
 CAGATAAATA GATRACCACC CGCACTATTA TATTTCATTA TTTAGAAAAC 3749
 CGAGATCTTT ATTTGAGTGA ATGAAATCT TCCTAACCAG ATAGTCATAC 3799
 TAATCAGTCA AAAAAAATC TAACCTCAA ATTTAAGCAT CCGAGCTGCAG 3850

92

【0379】配列番号：11
 配列の長さ：1103
 配列の型：核酸
 鎖の数：二本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：cDNA
 起源

生物名：TNVに感染したキュウリの葉
 直接の起源
 40 クローン名：pBSCucCh5〔ATCC4052
 8〕
 特性：酸性キチナーゼ遺伝子
 配列

```

AAAGAAAGCT CTTTAAGCAA TGGCTGCCCA CAAATAACT ACAACCGTTT 50
CCATCTTCTT CTTGCTTFCG TCTATTTTCG GCTCTTCGGA CGCGGCTGGA 100
ATCGCCATCT ATTGGGGTCA AAACGGCABC GAGGGCTCTC TTGCATCCAC 150
CTGCGCAACT GGAACACAG AGTTGGTCAA CATAGCAITT CTCTCATCCT 200
TTGGCAGCGG TCAAGCTCCA GTTCTCAACC TTGCTGGTGA CTGCAACCCG 250
GACAACAACG GTTGGGCTTT TTTGAGCGAC GAAATAAATC CTTGCAAAAG 300
TGAATAATGTC AAGGTCCTCC TCTCTATCGG TGGTGGCGCG GGGAGTTATT 350
CACTCTCCTC CGCCGACGAT GCGAAACAAG TCGCAAACTT CATTTGGAAC 400
AGCTACUUTT GCGGGCAGTC GGATTCCAGG CCACTTGGCG CTGCGGTTTT 450
GGATGGCGTT GATTTCGATA TCGAGTCTGG CTCGGGCCAG TTCGCGGACC 500
TACTAGCTCA GGAGCTAAAG AATTTGGGAC AAGTCAITTT ATCTGCGCGG 550
CGCGAGTGTG CAATACCAGA CGCTCACCTA GCGCCCGCGA TCAAAACTGG 600
ACTGTTGGAT TCCGTTGGG TTTCAATCTA CAACAACCGG CCATGCAITG 650
TTGAGATAAA CCGCGACAAT TCTCTGAGTT CATGGAACTA GTGGACGGCG 700
TTCCGAGAT CGAAGCTTGA CATGGGATG CCAGCGGCAC GGGAGGAGC 750
GCGGACCGGG GGATTATTTC CGCGGATGT GCTTATTTCT CAAGTCTCTC 800
CAACCATTA AGCTTCTTCC AACTATGAG GAGTGATGTT ATGGAGTAAG 850

GCGTTGACA ATGGCTACAG CGATTCCATT AAAGGCAGCA TCGGCTGAAG 900
GAAGCTCCTA AGTTAAATTT TAATTAAAGC TATGAATAAA CTCCAAAGTA 950
TTATAATAAT TAAAAAGTGA GACTTCATCT TCTCCATTTA GTCTCATATT 1000
AAATTAGTGT GATGCAATAA TTAATATCCT TTTTTCATT ACTATACTAC 1050
CAATGTTTAA GAATGAAA GTTGATGCA ATAAAACAT TCCAAGTTA 1100
TTT 1103

```

【0380】配列番号：12

配列の長さ：69

配列の型：核酸（および相当するアミノ酸）

配列の種類：mRNAからのcDNA

起源

生物名：ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)

直接の起源

クローン名：pBS-Gluc39.1 [ATCC40526; EP-A0332104に記載]

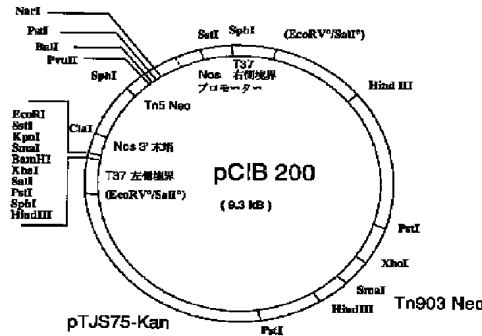
特性：液胞内への結合タンパク質分子の局在に関連するシグナルペプチドをコードする

20 配列GTC TCT GGT GGA GTT TGG GAC AGT TCA GTT GAA AC
T AAT GCT ACT GCT TCT CTCVal Ser Gly Gly Val Trp A
sp Ser Ser Val Glu Thr Asn Ala Thr Ala Ser Leu GTA
AGT GAG ATG TGA Val Ser Glu Met End

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpCIB200の遺伝子地図を示す。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K	7/06	Z 8318-4H		
	7/08	8318-4H		
	7/10	8318-4H		
	13/00	7731-4H		
C 1 2 N	1/21	7236-4B		
	5/14			

9/42

7823-4B

15/11

// C 0 7 K 99:00

(72)発明者 イエン-マルク ノイハウス
スイス国 4054 バーゼル ゲツシエネン
シユトラーゼ 28

(72)発明者 ジヨン ライアルズ
アメリカ合衆国 ノースカロライナ
27713 ダーラム サンダーリング コー
ト 14